

**IMPACTS MOLÉCULAIRES DE L'INACTIVATION DE DLK
DANS LES CELLULES NEURONALES**

par

Shirley Caron

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 2020

Le 23 décembre 2020

Le jury a accepté le mémoire de Madame Shirley Caron dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Richard Blouin
Directeur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Nicolas Gévry
Codirecteur de recherche
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Viktor Steimle
Évaluateur interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Blouin de m'avoir donné l'opportunité de faire une maîtrise dans son laboratoire. Je tiens à souligner sa disponibilité et sa confiance. Je remercie aussi mon collègue de laboratoire Guillaume St-Cyr pour les journées passées au laboratoire Blouin, pour son aide et pour m'avoir permis de poursuivre mes travaux grâce à ses résultats préliminaires. J'aimerais aussi exprimer ma reconnaissance à mon codirecteur, Dr Nicolas Gévry pour m'avoir permis d'élargir mes connaissances sur les récepteurs nucléaires en m'ayant reçu dans son équipe. Je remercie donc tous les membres du laboratoire Gévry, mais particulièrement Stéphanie Bianco, Mylène Brunelle, Martin Morin, Joannie Connell et Lysianne Papineau, qui m'ont aidé dans l'apprentissage de différentes techniques.

Je veux aussi remercier mes deux conseillers, les Drs Viktor Steimle et Sébastien Rodrigue, qui m'ont donné des pistes de solutions. Merci aussi à Manon Dufresne, à Daniel Garneau et aux Drs Alexandre Maréchal et Daniel Lafontaine.

Je suis très reconnaissante envers mes collègues qui ont été présents pour moi et avec qui j'ai partagé d'excellents moments : Lysianne, Maïlyn, Jorge, Isabelle, Nancy, Cynthia, Jean-Christophe et Lisa. Enfin, merci à tous ceux et celles qui ont fait une différence positive pendant mon cheminement universitaire. Du côté personnel, j'aimerais remercier ma mère Diane, qui a été présente pour moi et qui m'a soutenu tout au long de mes études. Merci aussi à ma grand-mère Jeannine et à mes ami(e)s : Jacynthe, Annie Michele, Simon, Martine, France et Réal pour leur amitié, écoute et disponibilité, ce qui m'a redonné de la motivation lors des moments les plus difficiles.

Finalement, merci aux organismes subventionnaires de ce projet, c'est-à-dire l'Université de Sherbrooke, les Fonds de recherche Santé Québec (FRSQ) et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG).

SOMMAIRE

La différenciation cellulaire est un processus complexe dont l'induction nécessite l'activation de certaines voies de signalisation. Dans le tissu nerveux, par exemple, il a été démontré que l'activation de la cascade de signalisation Dual Leucine Zipper Kinase (DLK) /Jun N-terminal Kinase (JNK) est essentielle pour la formation des neurites, ces prolongements du corps cellulaire des neurones qui servent de précurseurs aux dendrites et axones. L'un des effecteurs de cette voie, le facteur de transcription c-Jun, régule l'expression de plusieurs gènes dont ceux impliqués dans l'axonogenèse. Ce projet avait comme but principal de tester l'hypothèse que DLK contrôle une partie de l'axonogenèse dans les neurones en régulant l'expression des gènes clefs participants à ce processus. Pour y parvenir, la production de lignées clonales où *Dlk* est inactivée par le système CRISPR/Cas9 et la caractérisation de celles-ci a permis de valider que l'absence de DLK engendre un défaut de croissance des neurites dans les cellules Neuro-2a. Après qu'une analyse ChIP-seq de c-Jun ait été réalisé dans un modèle Neuro-2a différencié où DLK est déplétée, des gènes dont l'enrichissement de c-Jun à la chromatine variait en comparaison au contrôle ont été ciblés. Ensuite, l'effet de l'inactivation de DLK sur leur expression a été évalué par rt-qPCR. L'augmentation de l'expression des gènes Sémaphorine 6d (*Sema6d*) et *Insulin like growth factor 1 receptor (Igf1r)* a été constatée dans les lignées clonales en comparaison au contrôle. Cette hausse d'expression génique se traduit par l'augmentation du niveau protéique de SEMA6D. De plus, bien que le contrôle ne subisse aucune variation d'expression de *Sema6d* entre les conditions de prolifération et celles de différenciation, le niveau de SEMA6D atteint presque le triple pour les cellules lorsqu'elles se différencient. Les résultats de ce projet suggèrent que la voie DLK/JNK régule l'expression de ces gènes au niveau transcriptionnel de même que possiblement au niveau post-traductionnel dans les Neuro-2a. Donc, c-Jun pourrait être un régulateur négatif de *Sema6d* et *Igf1r*. Ces résultats sont primordiaux, considérant que l'augmentation de ces protéines pourrait affecter les bienfaits prometteurs de l'inhibition de DLK pour traiter les maladies neurodégénératives.

Mots clefs : DLK, différenciation neuronale, Neuro-2a, c-Jun, JNK, SEMA6D, IGF1r.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 1– INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 La différenciation cellulaire | 1 |
| 1.2 Abrégé de la neurogenèse..... | 3 |
| 1.3 Les voies de signalisation et fonctions de JNK..... | 6 |
| 1.4 La voie de signalisation neuronale de DLK/JNK..... | 11 |
| 1.5 Attributs et signalisation de la kinase DLK..... | 14 |
| 1.5.1 Les cibles de DLK | 16 |
| 1.5.2 Fonctions de DLK dans le développement..... | 17 |
| 1.5.3 DLK dans les situations de dommages aux neurones..... | 20 |
| 1.5.4 Fonctions de DLK en situation de stress et de blessures du SN..... | 20 |
| 1.5.5 Implication de DLK dans les maladies neurodégénératives..... | 22 |
| 1.6 La protéine c-Jun : un facteur de transcription important de la voie DLK/JNK..... | 22 |
| 1.7 Hypothèse et objectifs du projet..... | 24 |
| 1.8 Modèle cellulaire Neuro-2a..... | 26 |
| CHAPITRE 2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 27 |
| 2.1 Préparation des plasmides..... | 27 |
| 2.2 Conditions de culture cellulaire pour la prolifération et la différenciation..... | 28 |
| 2.3 Production virale par transfection des cellules HEK293T..... | 28 |
| 2.4 Transduction et sélection des systèmes CRISPR/Cas9..... | 28 |
| 2.5 Production de lignées clonales CRISPR/Cas9 DLK..... | 29 |
| 2.5.1 Extraction et amplification de l'ADN..... | 29 |
| 2.6. Analyse protéique par immunobuvardage de type western..... | 30 |
| 2.7 Caractérisation de la prolifération cellulaire et de la croissance des neurites..... | 32 |
| 2.8 Détermination des gènes à l'étude..... | 32 |
| 2.9 Analyse de l'ARNm par rt-qPCR..... | 33 |
| CHAPITRE 3 – RÉSULTATS..... | 36 |
| 3.1 Présentation générale du projet réalisé..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 Établissement d'un modèle de cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9-DLK KO..... | 38 |
| 3.3 Phénotypes des lignées clonales stables..... | 40 |
| 3.4 Évaluation de l'expression des gènes ciblés ayant un rôle à jouer dans la neurogenèse..... | 44 |
| 3.5 La protéine SEMA6D est augmentée en conditions de différenciation et dans les lignées clonales Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO..... | 50 |
| CHAPITRE 4 – DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE..... | 53 |
| 4.1 Les cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO sont un excellent modèle d'étude... | 53 |
| 4.2 Facteurs contribuant à la stabilité de l'expression des gènes déterminés..... | 55 |
| 4.3 c-Jun interviendrait comme régulateur négatif d' <i>Igf1r</i> et de <i>Sema6d</i> | 57 |
| 4.4 IGF1r serait possiblement une voie de secours..... | 58 |
| 4.5 Le rôle de la voie DLK/JNK dans la régulation de <i>Sema6d</i> | 60 |
| 4.6 Modèle proposé de la voie DLK/JNK..... | 62 |
| 4.7 Deux modèles d'études qui peuvent apporter des résultats différents, mais valides. | 65 |
| 4.8 Les perspectives de ce projet..... | 68 |
| 4.9 Conclusion..... | 70 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 71 |

LISTE DES TABLEAUX

| | | |
|------------|--|----|
| Tableau 1. | Liste des plasmides utilisant le système CRISPR/Cas9 (Abm)..... | 27 |
| Tableau 2. | Liste des anticorps avec la concentration utilisée et leur provenance..... | 31 |
| Tableau 3. | Amorces utilisées en fonction des gènes étudiés par rt-qPCR..... | 34 |
| Tableau 4. | Fonctions biologiques des gènes identifiés par ChIP-seq selon le GO..... | 46 |

LISTE DES FIGURES

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 1. | Représentation schématique de la différenciation des cellules totipotentes aux cellules spécialisées du système nerveux central (SNC)..... | 2 |
| Figure 2. | Représentation schématique de la neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire (SVZ)..... | 4 |
| Figure 3. | Organisation simplifiée et globale des voies de signalisation de JNK... | 7 |
| Figure 4. | Effets phénotypiques de l'inactivation de JNK1 dans la différenciation neuronale à partir de cellules souches murines..... | 9 |
| Figure 5. | Voie de signalisation simplifiée DLK/JNK dans les cellules neuronales | 13 |
| Figure 6. | Structure schématisée du gène et de la protéine DLK chez la souris | 15 |
| Figure 7. | Effet phénotypique de la déplétion de DLK sur la différenciation des cellules Neuro-2a..... | 18 |
| Figure 8. | Différenciation des neurones du cortex cérébral murin..... | 19 |
| Figure 9. | Complexe protéique permettant le signal rétrograde lors d'une blessure | 21 |
| Figure 10. | Voie de signalisation DLK/JNK investiguée dans les présents travaux... | 25 |
| Figure 11. | Morphologie des cellules Neuro-2a non différenciées et différenciées pendant 96 heures..... | 26 |
| Figure 12. | Représentation schématique du plan de travail réalisé au cours du projet..... | 37 |
| Figure 13. | Déplétion de DLK dans les cellules Neuro-2a..... | 39 |
| Figure 14. | Invalidation génique de <i>Dlk</i> dans les cellules Neuro-2a..... | 40 |
| Figure 15. | Caractérisation phénotypique des cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO..... | 43 |

| | | |
|------------|--|----|
| Figure 16. | Régions d'enrichissement de c-Jun sur la chromatine dans les Neuro-2a déplétées en DLK par ARN interférence..... | 45 |
| Figure 17. | Variation de l'expression des gènes sélectionnés selon les lignées cellulaires..... | 49 |
| Figure 18. | L'absence de DLK et la différenciation neuronale engendrent l'augmentation du niveau protéique de SEMA6D..... | 51 |
| Figure 19. | Modèle proposé de la voie DLK-LZK/JNK..... | 64 |
| Figure 20. | Schématisation des effets potentiels de c-Jun sur l'expression de SEMA6D entre les modèles shARN DLK KD et CRISPR/Cas9 DLK KO..... | 67 |

LISTES DES ABRÉVIATIONS

| | |
|-------------------|--|
| Δ | Delta |
| μg | Microgramme |
| μl | Microlitre |
| μM | Micromolaire |
| A | Adénine |
| aa | Acides aminés |
| <i>Abl2</i> | Gène de <i>ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase</i> |
| Abm | <i>Applied Biological Materials Inc.</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AKT | Protéine kinase B |
| ANOVA | <i>Analysis of variance</i> |
| AP-1 | Protéine activatrice 1 |
| AR+ | Traitement à l'acide rétinoïque et FBS 2 % |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARNi | Acide ribonucléique interférant |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ASK | <i>Apoptosis signal-regulating kinase</i> |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATF | <i>Activating transcription factor</i> |
| <i>Atg7</i> | Gène de <i>Autophagy related 7</i> |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BATF | <i>Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like</i> |
| Bcl2 | <i>Apoptosis regulator</i> |
| C | Cytosine |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| cAMP | Adénosine monophosphate cyclique |
| CAS ou Cas | Caspase |
| Cdc42 | <i>Cdc42 small effector protein</i> |
| Cdk | <i>Cyclin dependant kinases</i> |
| CHUL | Centre Hospitalier de l'Université Laval |
| c-Jun | <i>Transcription factor AP-1</i> |
| c-MAF | Transcription factor Maf |
| CRE | <i>cAMP response element</i> |
| CREB | <i>cAMP response element binding</i> |
| CRISPR/Cas9 | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated protein 9</i> |
| CT | Valeur du cycle au seuil de détection |
| DCX | <i>Neuronal doublecortin migration protein</i> |
| DRG | Ganglion de la racine dorsale |

| | |
|----------------------------------|--|
| DK | Domaine kinase |
| DLK | <i>Dual leucine zipper kinase</i> |
| <i>Dlk</i> | Gène de <i>Dual leucine zipper kinase</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| dNTP | Désoxyribonucléotide triphosphate |
| EGTA | Acide egtazique |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| <i>Etv4</i> | Gène de <i>ETS Variant Transcription Factor 4</i> |
| FBS | Sérum foetal bovin |
| FOSL | Fos-related antigen |
| G | Guanine |
| GADD45 | <i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha</i> |
| GAPDH | Protéine D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| <i>Gapdh</i> | Gène D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase |
| GO | <i>Gene ontology</i> |
| GP | Domaine riche en glycine et proline |
| GPCR | Récepteurs couplés aux protéines G |
| GSP | Domaine riche en glycine, sérine et proline |
| H ₂ KO ₄ P | Potassium dihydrogène phosphate |
| H ₂ O | Eau |
| H ₂ O ₂ | peroxide d'hydrogène |
| HCl | Acide chlorhydrique |
| HDAC2 | <i>Histone deacetylase 2</i> |
| HEK293T | <i>Human embryonic kidney 293</i> avec l'antigène T SV40 |
| <i>Igf1r</i> | Gène de <i>Insulin like growth factor 1 receptor</i> |
| IGFBP5 | <i>Insulin-like growth factor-binding protein 5</i> |
| JAK | <i>Janus kinases</i> |
| JDP2 | <i>Jun dimerization protein 2</i> |
| JIP | <i>JNK-interacting protein</i> |
| JNK | <i>c-Jun N-terminal kinase</i> |
| <i>Jun</i> | Gène qui encode la protéine c-Jun |
| JunD | <i>Transcriptor factor JunD</i> |
| KD | Déplétion ou <i>Knockdown</i> |
| kDa | Kilo dalton |
| KO | Invalidation génique ou <i>Knockout</i> |
| l | Litre |
| LRH1 | <i>Liver receptor homologue 1</i> |
| LZK | <i>Leucine zipper-bearing kinase</i> |
| M | Molaire |
| M value | Moyenne de la variance des gènes de contrôle interne |
| MAF | <i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i> |
| MAFA | <i>Transcription factor Maf A</i> |
| MAP1B | <i>Microtubule-associated protein 1B</i> |

| | |
|---------------------------------|---|
| MAP2 | <i>Microtubule-associated protein 2</i> |
| MAP2K | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> |
| MAP3K | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> |
| MBIP | <i>MUK-binding protein</i> |
| MEK1 | <i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase mek-1</i> |
| MEKK | MAPK/ERK kinase kinase |
| MgCl ₂ | Chlorure de magnésium |
| ml | Millilitre |
| MLK | <i>Mixed lineage protein kinase</i> |
| mM | Millimolaire |
| MMLV | <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> |
| MOI | Indice de multiplicité d'infection |
| MUK | <i>MAPK-upstream kinase</i> |
| N | Essai biologique ou réplica biologique |
| n | Réplica technique |
| Na ₃ VO ₄ | Sodium orthovanadate |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| <i>Ncam1</i> | Gène de <i>Neural cell adhesion molecule 1</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NEB | <i>New England Biolabs inc</i> |
| NeuroD | <i>Neurogenic differentiation factor</i> |
| NOD | <i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors</i> |
| NOTCH | <i>Neurogenic locus Notch homolog</i> |
| nt | Nucléotide |
| O ₂ ⁻ | Ion oxyde |
| <i>Oct4</i> | Gène de <i>Pou domain class 5 factor 1</i> |
| p53 | <i>Cellular tumor antigen p53</i> |
| PAM | <i>Protospacer adjacent motif</i> |
| pb | Paire de base |
| PBS | Tampon phosphate salin |
| p-c-Jun | Phospho-c-Jun ou c-Jun phosphorylé |
| PCR | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PEI | Polyéthylènimine |
| PERK | <i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i> |
| pH | Potentiel hydrogène |
| PKA | Protéine kinase A |
| pLKO.1 | Plasmide contrôle du système shARN |
| PMSF | Fluorure de phénylméthylsulfonyle |
| PVDF | Polyfluorure de vinylidène |
| qPCR | Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel |
| QR | Quantification relative |
| R | Purine |
| <i>Rab21</i> | Gène de <i>RAB21, member RAS oncogene family</i> |

| | |
|---------------|--|
| Rac1 | Ras-like protein TC25 |
| RIPK2 | <i>Receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2</i> |
| <i>Rplp0</i> | Gène de <i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i> |
| rpm | Rotation par minute |
| rt | Transcription inverse |
| S | Sérine |
| SDS | Laurylsulfate de sodium |
| SDS-PAGE | Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium |
| <i>Sema6d</i> | Gène de sémaphorine 6D |
| SEMA6D | Sémaphorine 6D |
| SEMAS | Familles des protéines sémaphorines |
| sgARN | <i>Single guide Ribonucleic acid</i> |
| sh73 | Système ARN interférant en petite tige boucle ciblant DLK |
| shARN | Système ARN interférant en petite tige boucle |
| SLA | Sclérose latérale amyotrophique |
| SN | Système nerveux |
| SNC | Système nerveux central |
| SNP | Système nerveux périphérique |
| SOCS | <i>Suppressor of cytokine signaling</i> |
| STAT | <i>Signal transducers and activators of transcription</i> |
| SVZ | Zone sous-ventriculaire |
| T | Thréonine ou Thymine selon le cas |
| Tab | <i>TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein</i> |
| TAK1 | <i>Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3</i> |
| TAO | <i>Thousand and one amino acid protein kinase</i> |
| Tau | <i>Tubule-associated unit</i> |
| TBP | <i>TATA-binding protein</i> |
| <i>Tbp</i> | Gène de <i>TATA-binding protein</i> |
| TBS-T | <i>Tris buffered saline with Tween 20</i> |
| TGFβ | <i>Transforming growth factor beta</i> |
| TLR | <i>Toll like receptor</i> |
| TNFα | <i>Tumor necrosis factor alpha</i> |
| TORC | <i>Transducer of regulated CBP</i> |
| TPA | 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate |
| TRAF | <i>TNF receptor-associated factor</i> |
| TRE | Élément de réponse TPA |
| Tris | Trisaminométhane |
| TRX | Thiorédoxine |
| Ubi | Ubiquitination |
| UTR | Région non traduite |
| Wnd/DLK | Wallenda |
| WT | Type sauvage (<i>Wild type</i>) |
| Y | Pyrimidine |

| | |
|---------------|---|
| ZL | Motif tirette à leucine |
| <i>Zmynd8</i> | Gène de <i>Zinc finger MYND-type containing 8</i> |
| ZPK | <i>Zipper protein kinase</i> |

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La différenciation cellulaire

Pour former un organisme pluricellulaire complexe, les cellules doivent posséder les capacités de proliférer et de se différencier. De plus, elles doivent maintenir leur propriété d'autorenouvellement, d'où l'appellation « cellule souche ». L'autorenouvellement diffère de la prolifération du fait que les cellules souches conservent leur capacité à produire plusieurs types cellulaires. Lorsque les cellules souches s'auto-renouvellent, la division asymétrique engendre deux types de cellules, soit une cellule qui est identique à la cellule mère et une qui est différenciée (Charbord et Casteilla, 2011). Donc, toutes les cellules dites « potentes » conservent la compétence de s'auto-renouveler et possède aussi la capacité de se différencier.

Chez les mammifères placentaires, les cellules totipotentes sont les premières cellules souches et diploïdes qui forment le zygote diploïde (figure 1). Celui-ci est formé lorsque l'ovule est fécondé par le spermatozoïde, qui sont des cellules germinales haploïdes. Les cellules restent totipotentes jusqu'au stade de 8 cellules (Démarchez, 2011). Ensuite, elles se différencient en cellules embryonnaires pluripotentes, qui forment l'épiblaste au stade blastocyste tardif (Démarchez, 2011). Les cellules totipotentes se distinguent par leur capacité à former des tissus externes à l'organisme. Effectivement, les cellules totipotentes peuvent former le placenta et le cordon ombilical en plus de toutes les autres cellules de l'organisme. Donc, à chaque étape de différenciation, la cellule acquiert des fonctions plus spécifiques. Ce processus se nomme la spécialisation, laquelle conduit à la formation des cellules du système nerveux central (SNC) entre autres (figure 1).

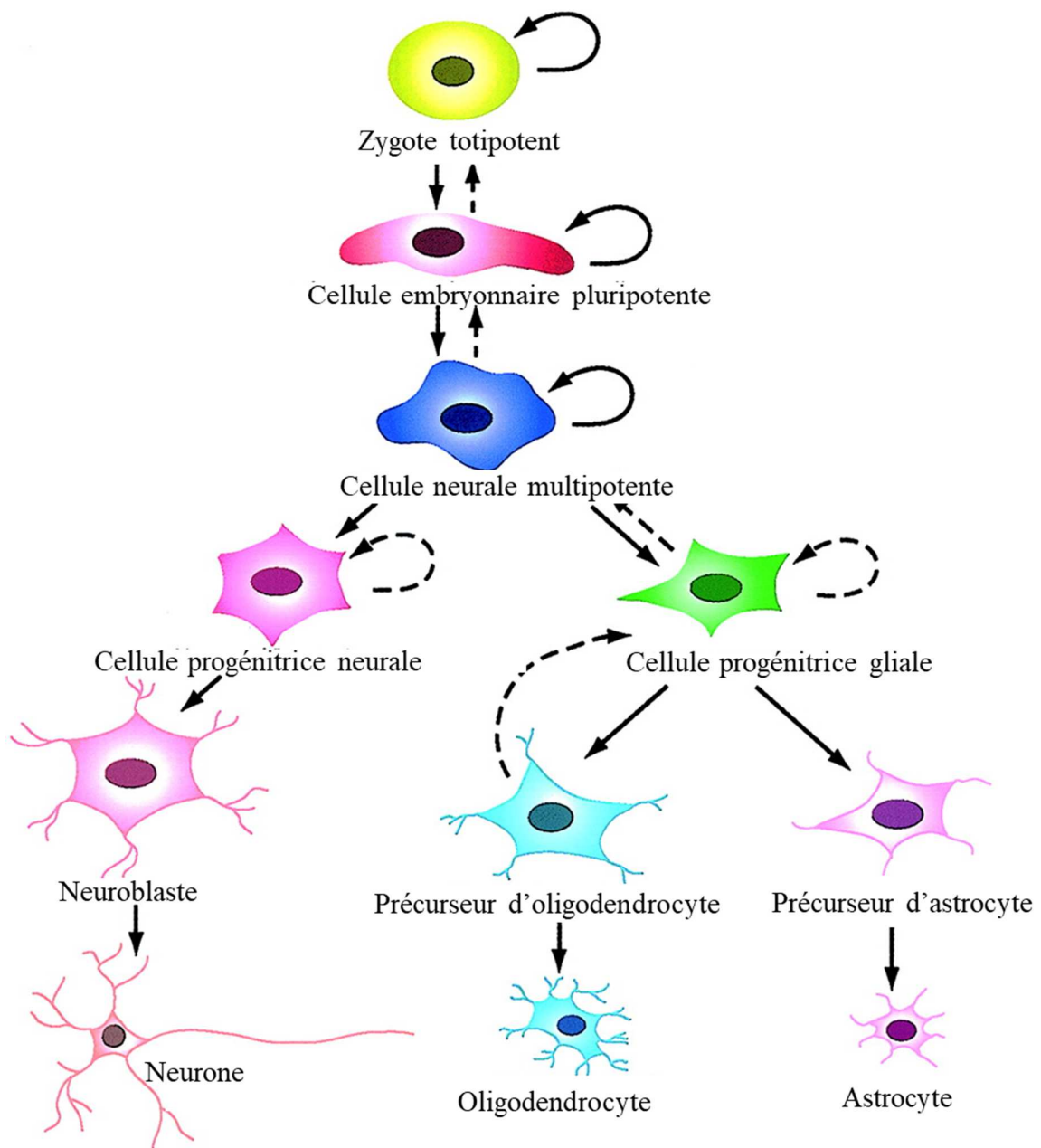


Figure 1. Représentation schématique de la différenciation des cellules totipotentes aux cellules spécialisées du système nerveux central (SNC).

Image adaptée d'Ahmad, 2001. Les flèches pleines représentent des événements plus fréquents qu'en pointillées.

1.2 Abrégé de la neurogenèse

Pendant le développement du SNC, les cellules pluripotentes se spécialisent en cellules neurales multipotentes. À partir de ce type de cellules, seules les cellules du SNC pourront émerger (figure 1). À ce stade crucial du développement embryonnaire, des signaux engendrent l'engagement des cellules souches neuronales multipotentes dans deux voies distinctes. Il y a la possibilité qu'elles deviennent soit des neurones ou soient des cellules gliales (figure 1) (Ahmed, 2001; Stergiopoulos *et al.*, 2015). Les cellules gliales qui émergent de cette voie sont les astrocytes et les oligodendrocytes (figure 1). Lorsque la cellule progénitrice neuronale se différencie en neuroblaste, des prolongements émergents du corps cellulaire. Ces prolongements, appelés neurites, deviendront des dendrites ou des axones (Hirai *et al.*, 2011). Pendant cette maturation, il y a aussi une migration des neuroblastes (Bloom *et al.*, 2007).

Bien que la neurogenèse embryonnaire soit une étape très importante, il est démontré depuis plus de 50 ans que la neurogenèse adulte existe aussi (Altman, 1962, Eriksson *et al.*, 1998, Boldrini *et al.*, 2018). C'est particulièrement dans les régions du cerveau du gyrus denté de l'hippocampe et de la zone sous-ventriculaire (SVZ) que la neurogenèse adulte persiste (Doestch *et al.*, 1997, Kuhn *et al.*, 1996). Dans la SVZ, il y a des niches d'astrocytes dormants qui peuvent rétrograder en cellules neuronales, qui une fois activées, sont aptes à l'auto-renouvellement et à la différenciation (figure 2) (Katsimpardi et Lledo, 2018). Enfin, comme dans la neurogenèse embryonnaire, les cellules neurales multipotentes sont activées et elles deviennent des cellules neurales progénitrices qui se différencient en neuroblastes, pour enfin devenir des neurones (figure 2).

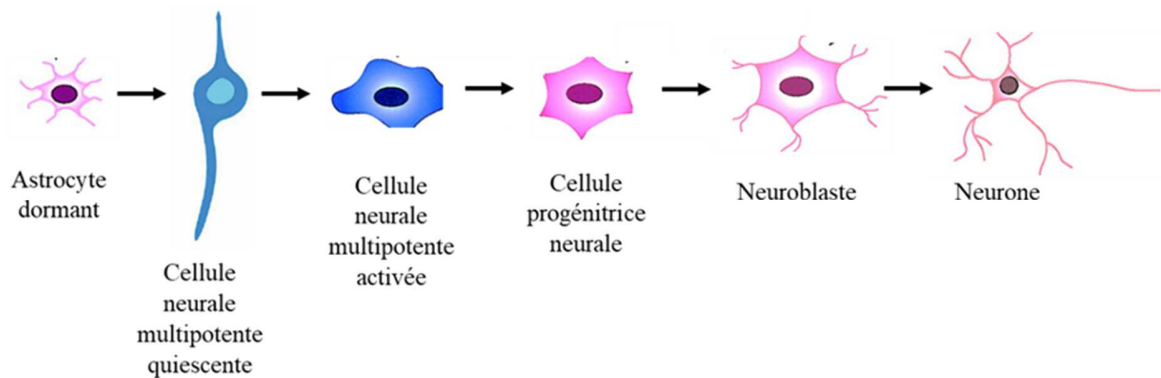


Figure 2. Représentation schématique de la neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire (SVZ).

Adapté d’Ahmad, 2001 et Katsimpardi et Lledo, 2018.

Que ce soit au niveau embryonnaire ou adulte, la neurogenèse est un processus complexe qui nécessite l’implication d’une multitude d’effecteurs cellulaires et d’éléments moléculaires finement régulés tant spatialement que temporellement. Effectivement, pour parvenir au développement du SN et du cerveau, plusieurs processus moléculaires sont requis. Pour donner un aperçu de la complexité, voici quelques exemples des voies et protéines impliquées dans la neurogenèse. D’abord, la voie de signalisation *Janus kinases/Signal transducers and activators of transcription* (JAK/STAT) est impliquée dans la prolifération des cellules multipotentes du SNC, dans la différenciation des astrocytes, dans l’inhibition de la croissance des neurites et dans la survie et l’apoptose des neurones (Nicolas *et al.*, 2013; Stergiopoulos et Politis, 2016). Les protéines *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS) 2, 3 et 6 régulent négativement la voie JAK/STAT et permettent la différenciation des précurseurs en neurones (Nicolas *et al.*, 2013). Une autre voie très importante dans l’embryogenèse, mais notamment dans la neurogenèse est celle de la voie *Neurogenic locus Notch homolog* (NOTCH), qui régule aussi la prolifération, la différenciation et le maintien des cellules souches neuronales et des neuroblastes (Berezovska *et al.*, 1999). Afin de permettre à la cellule de proliférer ou de se différencier, le cycle cellulaire doit être contrôlé. Donc, pour permettre cette régulation, les cyclines D1, D2 et D3 (G1/S-specific cyclin) ainsi que les *Cyclin dependant kinases* (Cdk) 2 et 4 régulent le cycle de la cellule,

entre autres par le récepteur nucléaire *Liver receptor homolog 1* (LRH-1) et peuvent induire la différenciation neuronale (Lukaszewicz et Anderson, 2011; Stergiopoulos et Politis, 2016). En plus, les travaux de Stergiopoulos et Politis (2016) ont montré que le récepteur nucléaire LRH-1 joue un rôle important dans la différenciation des cellules neuronales multipotente en neurones plutôt qu'en astrocytes via la voie NOTCH 1 et JAK/STAT. Aussi, issue du gène *Neurog2*, la neurogenin-2 participe au processus de la neurogenèse à partir des cellules neuronales multipotentes en activant des gènes de la famille *Neurogenic differentiation factor* (NeuroD) et participe, entre autres, à la croissance des axones (Wilkinson *et al.*, 2013).

Une autre composante importante du développement embryonnaire et de la neurogenèse est la voie de signalisation qui regroupe les protéines de la famille WNT. Ces protéines sont des ligands des protéines transmembranaires *frizzled*, un type de récepteur couplé à des protéines G (Bikkavilli et Malbon, 2009). La voie canonique Wnt/ β -catenin reçoit des stimuli, incluant des facteurs de croissance, des cytokines et des stress environnementaux, et régulent plusieurs processus via les *Mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) (Bikkavilli et Malbon, 2009). Les protéines WNTs permettent d'activer les MAPKs *Mitogen-activated protein kinase 11* (p38), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) pour permettre plusieurs réponses cellulaires, dont le maintien des précurseurs neuronaux et la différenciation neuronale ainsi que le développement du cerveau et de l'hippocampe (Bikkavilli et Malbon, 2009; Lee *et al.*, 2000). Finalement, bien que JNK puisse être activé via les signaux des WNTs et les récepteurs *frizzled*, cette protéine kinase faisant partie des MAPKs, peut être activé de plusieurs façons. Effectivement, selon le récepteur par lequel passe le signal extracellulaire et la voie de signalisation qui est activée, cette protéine participe à plusieurs fonctions (figure 3). Enfin, selon les éléments que JNK régule, dont plusieurs facteurs de transcription et protéines du cytosquelette entre autres, plusieurs réponses cellulaires sont possibles. Au niveau du SN, JNK est un élément de signalisation qui joue un rôle très important dans la différenciation cellulaire neuronale en participant à la migration des neuroblastes, à la croissance et à la régénérescence des axones, à la survie et à l'apoptose des neurones (Tedeschi et Bradke, 2013; Zeke *et al.*, 2016).

1.3 Les voies de signalisation et fonctions de JNK

Les protéines JNKs sont des MAPKs qui font partie d'une sous-famille de sérine/thréonine kinases. Les MAPKs sont intracellulaires et qui, par une cascade de phosphorylation, répondent à des signaux généralement extracellulaires de stress biotiques et abiotiques (figure 3) (Zeke *et al*, 2016). Pour répondre spécifiquement aux stimuli, il existe chez l'humain et chez la souris trois gènes *Jnk*; *Jnk1*, *Jnk2* et *Jnk3*, qui encodent ensemble 10 isoformes (JNK1 α 1, JNK1 α 2, JNK1 β 1, JNK1 β 2, JNK2 α 1, JNK2 α 2, JNK2 β 1, JNK2 β 2, JNK3 α 1, JNK3 α 2) (Gupta *et al.*, 1996; Davies et Tournier; 2012). Les kinases JNK1, JNK2 et JNK3 ont aussi les synonymes MAPK8, MAPK9 et MAPK10, respectivement. L'activation des JNKs se fait par d'autres MAPK kinases (MAP2K), dont MAP2K4 ou MAP2K7 (figure 3). Enfin, ces MAP2K sont activées par des MAP2K kinases (MAP3K), dont les membres de la famille des protéines *tyrosine kinase-like* soit *Mixed lineage protein kinase 3* (MLK3), *Dual leucine zipper kinase* (DLK), *Leucine zipper-bearing kinase* (LZK), *MAPK/ERK kinase kinase 4* (MEKK4) et MAP3K7 (TAK1) et ceux de la famille des kinases STE, soit STE20, STE11, et STE7 (chez la levure) et MEKK1, *Apoptosis signal-regulating kinase 1/2* (ASK 1/2) et les *Thousand and one amino acid protein kinase* (TAOs) (figure 3) (Zeke *et al*, 2016).

Selon le type de cellules, le signal peut être induit par différents récepteurs (figure 3). Il y a les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), qui sont activés par des hormones et neurotransmetteurs, et les récepteurs *frizzled* activés par les WNTs et par des signaux développementaux, comme les récepteurs TGF β (*Transforming growth factor beta*) (figure 3). Aussi, les récepteurs *Tumor necrosis factor alpha* (TNF α) sont régulés par des cytokines inflammatoires, les *Toll like receptors* (TLRs), par des pathogènes extracellulaires et enfin les pathogènes intracellulaires activent le complexe *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (NOD) (figure 3) (Zeke *et al*, 2016).

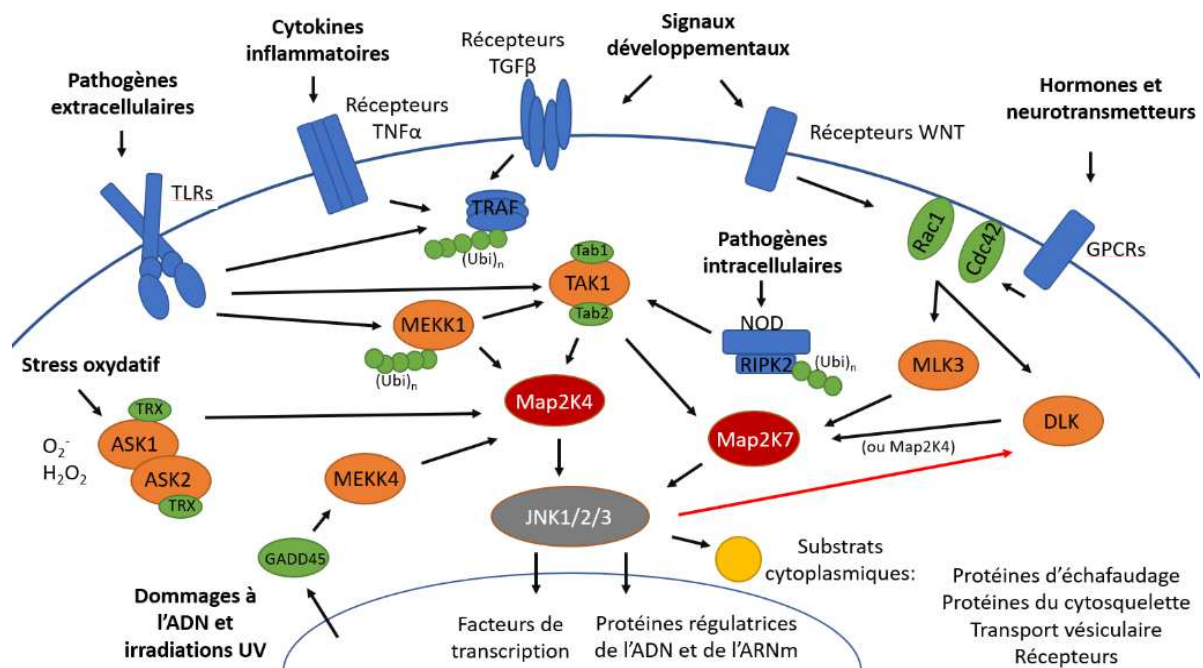


Figure 3. Organisation simplifiée et globale des voies de signalisation de JNK.

Image inspirée et adaptée de Zeke *et al*, 2016. Les voies sont activées par plusieurs stimuli intracellulaires et extracellulaires. Selon le récepteur cellulaire (bleu), les voies s'activent grâce aux éléments (vert) qui propagent le signal reçu aux MAP3Ks (orange); MAPK2s (rouge); JNKs (gris); éléments cytoplasmiques (jaune). Les flèches noires représentent des événements d'interaction et de phosphorylation. La flèche rouge représente une rétroaction par phosphorylation. TLRs, *Toll like receptor*; TNF α , *Tumor necrosis factor alpha*; TRAF, *TNF receptor-associated factor*; TGF β , *Transforming growth factors beta*; GPCRs, Récepteurs couplés aux protéines G; NOD, *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*; RIPK2, *receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2*; Ubi, Ubiquitination; TRX, Thiorédoxine; O $_2^-$, ion oxyde; H $_2$ O $_2$, peroxyde d'hydrogène; Tab, *TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein*; Rac1, *Ras-like protein TC25*; Cdc42, *Cdc42 small effector protein*; DLK, *Dual leucine zipper kinase*; MLK3, *Mixed lineage kinase 3*; TAK1, *Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3*; MEKK1/4, *MAP/ERK kinase kinase 1 ou 4*; ASK1/2, *Apoptosis signal-regulating kinase 1 ou 2*; GADD45, *Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha*; JNK1/2/3, *c-Jun N-terminal kinase 1 ou 2 ou 3*.

Les protéines JNKs ont comme substrat plusieurs protéines du cytoplasme, du cytosquelette, de la mitochondrie et d'autres associées à la membrane cellulaire (figure 3) (Zeka *et al.*, 2016). Dans le cytoplasme, l'interaction peut se faire avec les récepteurs nucléaires des glucocorticoïdes et des androgènes ou d'autres MAPKs, comme DLK qui peut recevoir un signal de rétroaction direct (figure 3) (Gioeli *et al.*, 2006; Itoh *et al.*, 2002; Huntwork-Rodriguez *et al.*, 2013). Toujours dans le même compartiment cellulaire, les protéines JNKs interagissent avec différentes protéines échafauds, dont *JNK-interacting protein 1 et 3* (JIP1) (JIP3), qui sont associées aux MAPKs (Nihalani *et al.*, 2003; Kelkar *et al.*, 2000). Aussi, les protéines JNKs peuvent avoir comme substrat, les protéines *Tubule-associated unit* (Tau) et *Apoptosis regulator* (Bcl2), où la première fait partie intégrante du cytosquelette et l'autre régule les pores de la mitochondrie, l'apoptose et l'autophagie (Yoshida *et al.*, 2004; Ploia *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2008). De plus, l'aquaporine 2 est un exemple de protéine associée à la membrane cellulaire avec qui les JNKs peuvent interagir (Rinschen *et al.*, 2010). Enfin, les protéines JNKs peuvent aussi transloquer au noyau et phosphoryler certains facteurs de transcription, dont *Transcription factor AP-1* (c-Jun), *Activating transcription factor 2* (ATF2), *transcription factor JunD* (JunD), *cellular tumor antigen p53* (p53) et STAT1 (Zeka *et al.*, 2016).

Il est évident que les voies des JNKs sont complexes en composantes. Cette variété apporte donc son lot de fonctions biologiques. Les JNKs sont donc non seulement impliquées dans la neurogenèse, mais elles participent, selon le type cellulaire à l'activation et à la régulation des cellules immunitaires, à la croissance, à la prolifération et à la différenciation cellulaire, à l'embryogenèse et à la carcinogenèse (Davies et Tournier, 2012; Zeke *et al.*, 2016).

Pour tenter de comprendre quelle importance chaque JNK a dans la différenciation neuronale, l'équipe de recherche d'Amura *et al.* (2005) a créé des lignées de cellules souches embryonnaires murines où JNK1, JNK2 et JNK3 ont été déplétées individuellement. Par la suite, un protocole de différenciation neuronale a été effectué pour chacune des lignées. Les résultats ont clairement démontré que la différenciation neuronale est inhibée dans la lignée déplétée de JNK1 (figure 4) (Amura *et al.*, 2005). Dans cette figure, il est possible de constater qu'aucun neurite ne s'est formé. Cette réponse n'est pas observée dans les lignées déplétées de JNK2 et

de JNK3. De plus, les auteurs ont quantifié l'expression du gène *Pou domain class 5 factor 1* (*Oct4*) par la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR). Ce marqueur permet de déterminer que la cellule conserve sa pluripotence, donc qu'elle reste à un stade plus précoce que celui du neuroblaste, car le maintien de cette caractéristique empêche la différenciation. Les résultats montrent que l'abondance de ce marqueur est au moins doublée comparativement au gène rapporteur D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (*Gapdh*), en passant de $1,1 \pm 0,2$ à $2,4 \pm 0,6$ (Amura *et al.*, 2005). Un autre résultat intéressant de cette étude est que les auteurs ont quantifié par qPCR l'expression des gènes *Wnt4* et *Wnt6*. Dans le modèle déplété de JNK1, l'expression de *Wnt4* est augmentée d'environ 10 fois et celle de *Wnt6* est augmentée du double comparativement au contrôle négatif (Amura *et al.*, 2005). Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'expression de ces gènes, qui sont inhibiteurs de la différenciation neuronale, serait inhibée par JNK1 (Amura *et al.*, 2005).

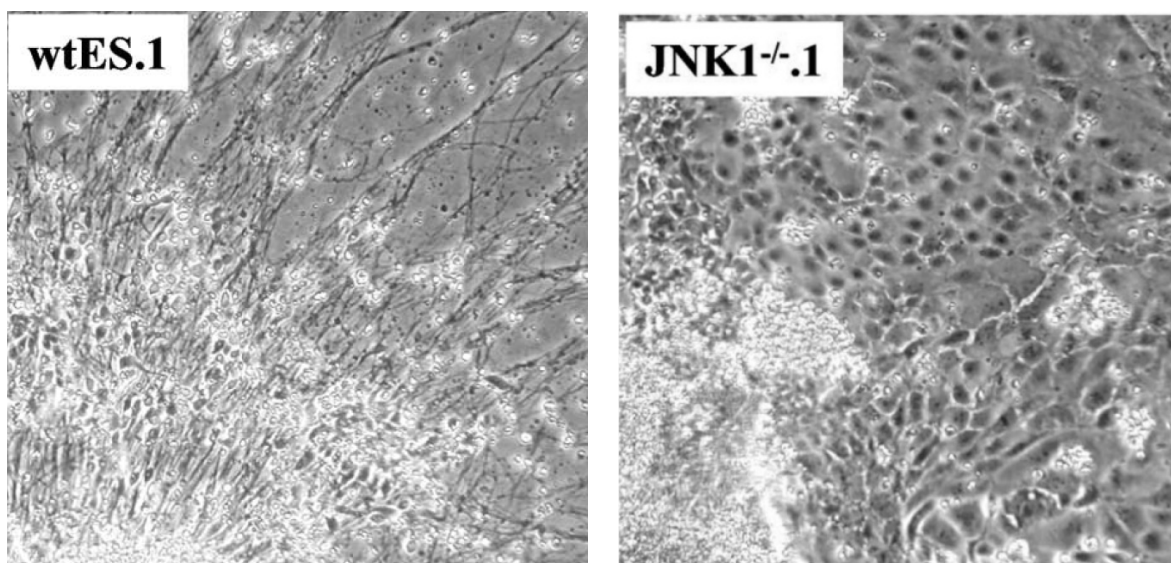


Figure 4. Effets phénotypiques de l'inactivation de JNK1 dans la différenciation neuronale à partir de cellules souches murines.

Images de Amura *et al.* 2005. État des cellules souches induites à se différencier en neurones pendant 7 jours. wtES.1, cellules souches de type sauvage; JNK1^{-/-}.1, cellules souches déplétées de JNK1.

Les effets de l'inactivation des JNKs dans les souris restent à élucider, ce qui rend difficile l'attribution de rôles certains et particuliers à chacune des JNKs. Lorsque les JNKs sont déplétées génétiquement et de façon individuelle, aucune mutation n'est létale (Kuan *et al.*, 1999; Amura *et al.*, 2005). Cependant, les doubles mutations homozygotes JNK1 et JNK2 empêchent la fermeture du tube neural et sont létales pour l'embryon aux alentours du jour 11 de gestation (Kuan *et al.*, 1999; Sabapathy *et al.*, 1999). Pendant l'embryogenèse, des résultats ont montré que l'expression des JNKs varie dans le temps et selon les tissus. Effectivement, à la 14^e journée du développement embryonnaire, JNK3 n'est présente que dans le SN, tandis que JNK1 et JNK2 sont ubiquitaires, à l'exception de la rate (Kuan *et al.*, 1999). L'expression de JNK1 et de JNK2 était détectable dans l'embryon dès la 7^e journée de développement, tandis que JNK3 l'était seulement à partir de la 11^e journée (Kuan *et al.*, 1999).

Du côté de la neurogenèse adulte, il a été démontré que l'inhibition de JNK1 stimule celle-ci en augmentant significativement le nombre de neurones immatures par rapport au contrôle (Castro-Torres *et al.*, 2019). Cependant, l'effet inverse a été observé lorsque JNK3 est inactivé et aucune différence n'a été observée avec l'inactivation de l'isoforme 2 (Castro-Torres *et al.*, 2019). Ceci était en accord avec les travaux de Mohammad *et al.* (2018) qui avaient également montré que l'inhibition ou la déplétion de JNK1 favorisait la neurogenèse adulte. Dans cette dernière étude, les auteurs avaient de plus démontré que l'inhibition de JNK1 à long terme diminuait l'anxiété et les symptômes de dépression chez les souris (Mohammad *et al.*, 2018).

Les auteurs des études précédemment citées émettent l'hypothèse que les JNKs partagent des rôles et qu'elles sont redondantes, c'est-à-dire qu'elles peuvent parfois jouer le rôle d'une autre dans le cas où cette dernière serait absente ou non fonctionnelle (Mohammad *et al.*, 2018; Castro-Torres *et al.*, 2019). Puisqu'il est encore difficile d'attribuer des rôles individuels exclusifs bien définis aux JNKs, l'appellation JNK sera utilisée dans ce travail et inclut de façon générale les trois JNKs sans distinction individuelle.

Alors, dans les cellules neuronales, JNK participe à la migration neuronale, à la polarité cellulaire, à la croissance et à la régénérescence axonale, à la neurodégénérescence, à la survie

et à l'apoptose (figure 5) (Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng, 2019). Pour parvenir à ces réponses cellulaires lors du développement embryonnaire du SN, de la neurogenèse embryonnaire ou adulte, une voie particulière de JNK est empruntée. Cette voie primordiale est celle dont les signaux reçus sont transmis en premier lieu par la protéine kinase DLK.

1.4 La voie de signalisation neuronale de DLK/JNK

Un signal extracellulaire est nécessaire pour activer la cascade via un récepteur (figure 5). Après la transmission d'un signal et l'activation de GTPases, qui passe possiblement par les GPCRs, une cascade se produit entre plusieurs kinases, dont DLK, MAP2K4, MAP2K7 et JNK (figure 5). Une fois phosphorylée, JNK peut soit phosphoryler des substrats cytoplasmiques ou soit transloquer au noyau pour phosphoryler des facteurs de transcription et provoquer une réponse spécifique (figure 5). Comme illustré, il existe plusieurs protéines associées aux microtubules qui jouent un rôle dans la stabilité de ceux-ci. D'abord, les *Microtubule associated proteins 1B* (MAP1B), qui sont impliquées dans la croissance des axones et dans la polarité neuronale et MAP2 qui empêcherait la dépolarisation de ceux-ci (Bjorkblom *et al.*, 2005; Eto *et al.*, 2010). Aussi, une fois phosphorylée par JNK, la protéine *Neuronal migration protein doublecortin* (DCX) permet d'initier la migration cellulaire pendant la formation du cortex cérébral. Celle-ci joue aussi un rôle au niveau de l'acquisition de la polarité neuronale (Hirai *et al.*, 2006 et 2011). Enfin, *Superior cervical ganglion 10 protein* (SCG10), sous sa forme phosphorylée, régule aussi la stabilité des microtubules et contrôle en plus la longueur des neurites (Hirai *et al.*, 2011). SCG10 jouerait aussi un rôle important dans la dégénérescence wallérienne, un processus où il y a une autodestruction de l'axone (Shin *et al.*, 2012^B). Lorsqu'elle reçoit un signal provenant de DLK, JNK ne phosphoryle pas directement les caspases 3 et 9, mais elle permet d'activer une voie qui affecte la polarisation de la mitochondrie et qui induit le relâchement du cytochrome C, qui ensuite active les caspases, lesquelles provoquent l'apoptose ou la neurodégénérescence (Itoh *et al.*, 2002; Dhanasekan et Reddy, 2008; Gosh *et al.*, 2011). Comme illustré à la figure 5, JNK peut aussi phosphoryler des protéines de la mitochondrie comme Bcl2, qui est un régulateur de l'apoptose (Garcia *et al.*, 1998; Bogoyevitch et Kobe, 2006). Cependant,

les études sont contradictoires à savoir si la phosphorylation de la sérine 70 de Bcl2 par JNK accentue son effet anti apoptotique ou bien apoptotique (Ito *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1999).

Lorsque JNK transloque au noyau, elle phosphoryle des substrats nucléaires dont des facteurs de transcription. Comme illustré à la figure 5, il existe trois principaux facteurs de transcription phosphorylés par JNK dans les cellules neuronales. D'abord, STAT3 qui peut également se retrouver dans les axones des neurones. Donc, lors d'une blessure à l'axone, plus précisément lors d'une coupe transversale des neurones du ganglion de la racine dorsale (DRG) de la moelle épinière, il est localement phosphorylé à ce niveau par JAK kinase (Qiu *et al.*, 2005). Lors d'une compression sévère de la moelle épinière chez la souris, l'équipe de Yamauchi *et al.* (2006), a démontré que STAT3 est phosphorylé sur la tyrosine 705. L'étude de Zhang *et al.* (2001) a montré que JNK phosphoryle STAT3 sur la sérine 727. Cependant, bien que STAT3 puisse être phosphorylé par JNK, une étude a démontré que DLK n'est pas requise pour la phosphorylation de STAT3 lors d'une blessure dans le SNP, mais qu'elle est nécessaire pour le transport du signal rétrograde de STAT3 vers le corps cellulaire (Shin *et al.*, 2012^A). Enfin, les facteurs de transcription ATF2 et c-Jun sont aussi phosphorylés par JNK. ATF2 est impliqué dans la polarité neuronale et dans la formation des axones (Oliva *et al.*, 2006). En ce qui concerne c-Jun, il a été démontré que celui-ci jouait un rôle dans la migration, dans la régénération axonale et paradoxalement dans la dégénérescence (Hirai *et al.*, 2006; Gosh *et al.*, 2011; Itoh *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2012^A). Bien qu'elle n'ait pas de fonction connue dans la croissance de l'axone au cours du développement, la protéine c-Jun est un facteur de transcription aux multiples fonctions. Il demeure donc possible qu'elle soit impliquée dans la formation des neurites, dendrites et axones lors du développement. Ceci sera discuté au point 1.5.

Enfin, la voie DLK/JNK inclut des protéines d'échafaudage qui ne sont pas illustrées, mais JIP3 l'est à la figure 9. Le fait que DLK interagisse ou non avec les protéines échafaud JIP1 ou JIP3 induit une réponse différente et cette caractéristique est une autre façon de réguler la fonction de la voie de signalisation (Tedeschi et Bradke, 2013).

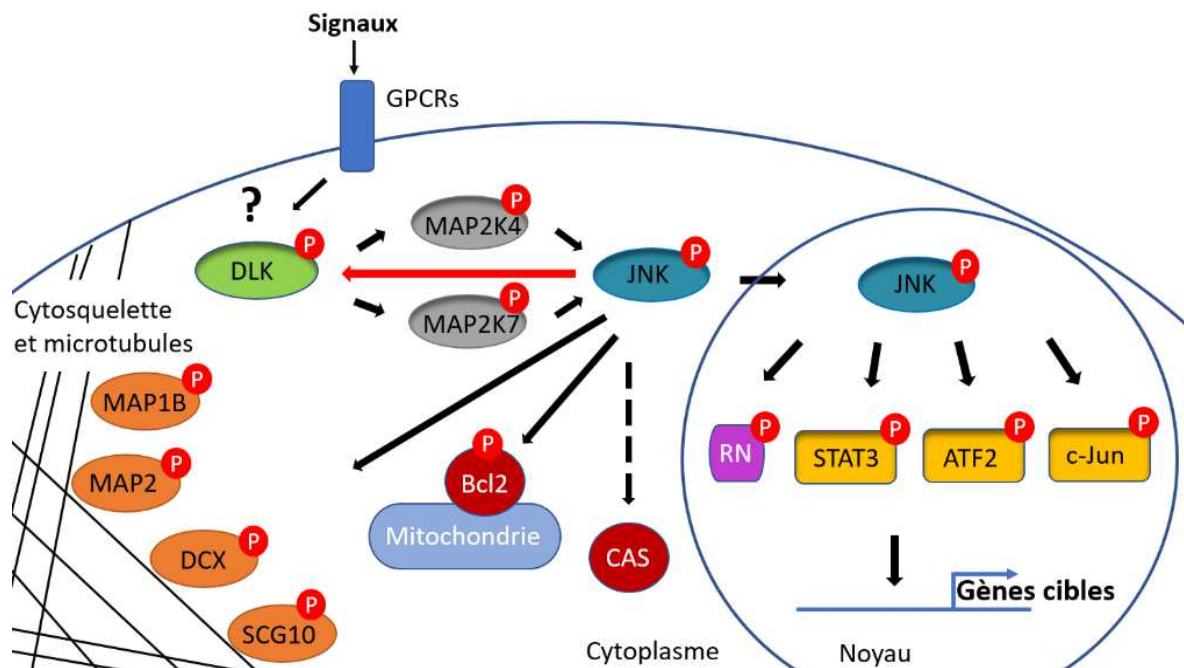


Figure 5. Voie de signalisation simplifiée DLK/JNK dans les cellules neuronales.

Image inspirée et adaptée de Tesdeschi et Bradke (2013). La cellule reçoit un signal qui est transmis à DLK (vert). La cascade de phosphorylation (petits cercles rouges avec P) se poursuit via les MAPK2K4/7 (gris) pour atteindre JNK (bleu). Celle-ci peut phosphoryler des substrats cytoplasmiques, comme les protéines associées aux microtubules (oranges). JNK peut aussi induire l'apoptose en activant indirectement les caspases 3 et 9 (rouge) via une voie non illustrée qui passe par la mitochondrie. Une fois phosphorylé, Bcl2 (rouge) à la membrane de la mitochondrie participe à la survie et à l'apoptose. JNK peut transloquer au noyau et phosphoryler des facteurs de transcription (jaune) ou des récepteurs nucléaires (mauve) qui vont entraîner différentes réponses biologiques discutées dans le texte. La flèche en rouge représente une rétroaction directe par JNK sur DLK. GPCRs, récepteurs couplés aux protéines G; DLK, *Dual leucine zipper kinase*; MAPK2; *Mitogen-activated protein kinase kinase*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; RN, récepteurs nucléaires; STAT3, *signal transducer and activator of transcription 3*; ATF2; *Activating transcription factor 2*; CAS; Caspases 3 et 9; Bcl2, *Apoptosis regulator*; MAP1B/2, *Microtubule associated protein 1B ou 2*; , *Neuronal migration protein doublecortin*; SCG10, *Superior cervical ganglion 10 protein*.

1.5 Attributs et signalisation de la kinase DLK

La protéine DLK est une sérine/thréonine kinase qui fait partie de la famille des MLKs, un sous-groupe de MAP3K (Gallo et Johnson, 2002). DLK est un acronyme qui signifie *Dual leucine zipper-bearing kinase* (DLK). Cette protéine est aussi connue sous le nom de MAP3K12, *Zipper protéine kinase* (ZPK) et *MAPK-upstream kinase* (MUK) (Holzman *et al.*, 1994). DLK est principalement exprimée dans les reins, le cerveau, la moelle épinière et dans les racines des ganglions dorsaux, mais elle est aussi présente dans la peau, l'estomac, le petit intestin, le foie, le pancréas et dans les testicules (Reddy et Pleasure, 1994; Holzman *et al.*, 1994; Nadeau *et al.*, 1997; Hirai *et al.*, 2002). Elle possède un signal de localisation nucléaire, bien qu'elle soit généralement présente dans le cytoplasme, dans les cônes de croissance et aux axones des neurones (Hollande *et al.*, 2015, Jin et Zheng, 2019). Dans les cellules bêta du pancréas, DLK est dans le cytoplasme, mais elle transloque au noyau lorsque les cellules sont exposées à des cytokines inflammatoires (Wallbach *et al.*, 2016). DLK est active en dimère et peut-être inactivée lorsqu'elle interagit avec des protéines échafauds, par exemple avec la protéine inhibitrice *MUK-Binding Protein* (MBIP) (Fukuyama *et al.*, 2000).

DLK possède un domaine catalytique hybride entre ceux trouvés chez les sérine/thréonine kinases ou les tyrosine kinases et a un poids moléculaire d'environ 120 kDa (figure 6) (Gallo et Johnson, 2002). On retrouve *Dlk*, sur le chromosome 12 chez l'humain et 15 chez la souris selon la banque d'information *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Il existe deux isoformes de DLK chez l'humain, 892 et 859 acides aminés (aa) et le plus petit des isoformes est identique à 95% à celui de la souris, qui lui contient 888 aa (Blouin, 2018). Il y a cependant 3 variants d'acide ribonucléique messager (ARNm) chez la souris qui ne diffèrent que dans les régions non traduites (UTR). DLK est présente aussi chez les invertébrés et elle porte le nom de DLK-1 chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et de Wallenda (Wnd/DLK) chez la drosophile. Mis à part la longueur qui est de 977 aa, Wnd/DLK est similaire à DLK. En ce qui a trait à DLK-1, elle est constituée de 928 aa, n'a qu'un domaine tirette à leucine, mais contient cependant un motif hexapeptide (Jin et Zheng, 2018).

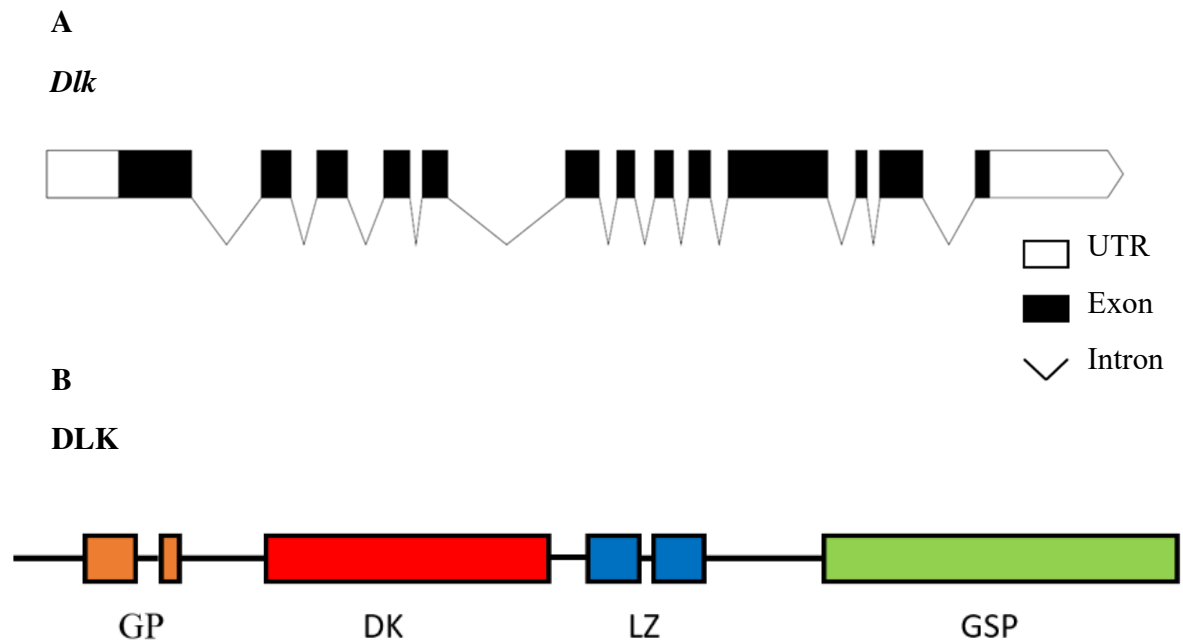


Figure 6. Structure schématisée du gène et de la protéine DLK chez la souris.

Adapté de Blouin, 2018. (A) Structure du gène chez la souris. Longueur totale du gène : 19358 nucléotides. (B) Structure de la protéine DLK chez la souris. GP : domaine riche en glycine et proline. DK : domaine kinase. LZ : motif tirette à leucine. GSP : domaine riche en glycine, sérine et proline.

En amont de son domaine kinase, DLK possède une cystéine où la palmitoylation est possible (Holland *et al.*, 2016). Aussi, comme dans tous les domaines catalytiques des protéines kinases, DLK possède une lysine qui est indispensable à la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) (Jin et Zheng, 2018). Toujours dans le domaine kinase, DLK possède dans sa boucle d'activation un résidu sérine à la position 302 qui peut être phosphorylée par la protéine kinase A (PKA), laquelle permettrait l'activation et la stabilisation de DLK et de Wnd/DLK (Hao *et al.*, 2016). Enfin, les domaines tirettes à leucine permettent la dimérisation de DLK et sont aussi essentiels à son activation. Effectivement, lorsqu'une seule lysine est mutée, DLK perd sa capacité à initier la cascade de phosphorylation qui fait en sorte que dans les circonstances, JNK n'est pas activée

(Nihalani *et al.*, 2000). Le domaine riche en glycine, sérine et proline ne semble pas être essentiel à l'activité de DLK, bien qu'une sérine (S584) et qu'une thréonine (T659) soient phosphorylées par la protéine kinase B (AKT) (Wu *et al.*, 2015). Cette phosphorylation, issue de la voie PI3K/AKT, régule négativement DLK et permet l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (Wu *et al.*, 2015). Aussi, dans les cellules bêta du pancréas, DLK régule négativement la transcription du gène de l'insuline en interagissant sur des coactivateurs de *cAMP response element binding* (CREB), soit *CREB-binding protein* et *transducer of regulated CBP* (TORC) (Phu do *et al.*, 2011).

1.5.1 Les cibles de DLK

Comme précédemment vu, DLK peut induire la phosphorylation de JNK via les MAP2K4 et MAP2K7, ce qui est la voie privilégiée dans les neurones. Cependant, il a été démontré que DLK peut aussi activer ERK dans les kératinocytes (Robitaille *et al.*, 2010). Dans ces cellules, DLK induit à la fois la phosphorylation de JNK et de ERK tout en favorisant leur différenciation terminale (Robitaille *et al.*, 2005). En plus, comme MLK3, DLK peut activer la voie p38 MAPK. Effectivement, les travaux de van der Vaart *et al.* (2015) ont montré que dans le modèle *C. elegans*, DLK était responsable de l'activation de p38 MAPK via la protéine *Dual specificity mitogen-activated protein kinase mek-1* (MEK1), qui est une MAP2K. Cette dernière est la kinase qui phosphoryle p38 MAPK. Cette voie régule la longueur des cils, qui est une organelle interne située à l'extrémité des dendrites chez *C. elegans* (van der Vaart *et al.*, 2015).

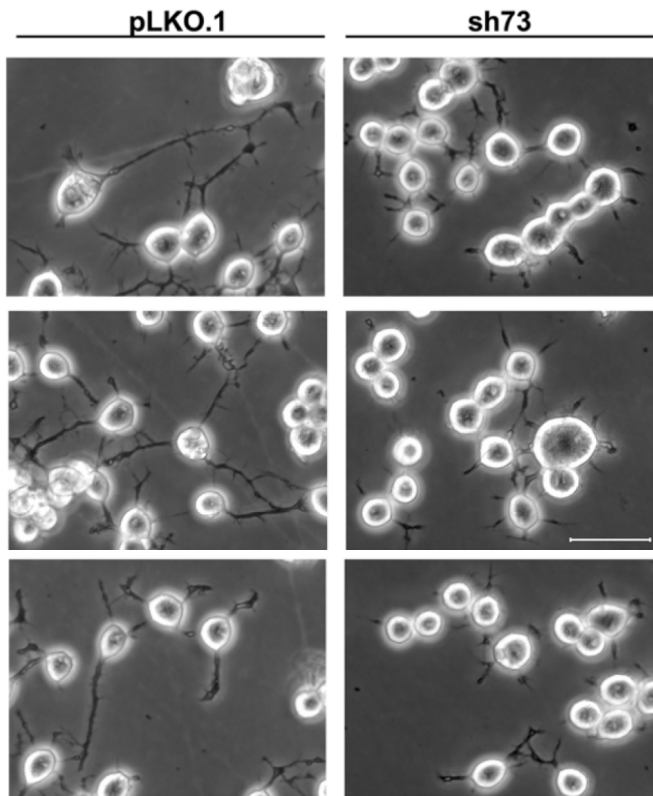
Dans un modèle de neurodégénérescence causé par un retrait de facteurs trophiques utilisant des neurones du ganglion de la racine dorsale de souris (Larhammar *et al.*, 2017), il a été montré que DLK est la kinase en amont de l'activation de la *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK). Dans ce modèle, la phosphorylation de JNK et de PERK se fait en parallèle. Une autre forme de régulation est la synergie des protéines conservées DLK et LZK. Cette dernière a comme synonyme MAP3K13 et dans certains cas, a un rôle similaire à celui de DLK, mais elle est beaucoup moins étudiée (Chen *et al.*, 2016; Jin et Zheng, 2018).

1.5.2 Fonctions de DLK dans le développement

Puisque DLK est impliquée dans la migration neuronale et dans la formation axonale, elle est essentielle à l'embryogenèse (Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng, 2019). Effectivement, l'équipe de Hirai *et al.* (2006) a altéré DLK dans un modèle murin en remplaçant les deux premiers exons ainsi qu'une partie du troisième par le gène *LacZ*, ce qui apporte une perte de fonction de DLK. Contrairement à la mutation hétérozygote où les descendants sont viables et fertiles, la mutation homozygote est létale de façon périnatale (Hirai *et al.*, 2006). Au 14^e du développement, les auteurs n'ont trouvé aucune différence entre les mutations, mais aux jours 18 et 19, les mutants homozygotes avaient un cerveau dont la commissure antérieure est affectée, c'est-à-dire que la portion antérieure de celle-ci n'était pratiquement pas détectable. Aussi, les auteurs ont observé que la partie postérieure de cette commissure et le corps calleux étaient réduits en grosseur comparativement au contrôle (Hirai *et al.*, 2006). De plus, la migration neuronale est affectée dans les mutants DLK homozygotes (Hirai *et al.*, 2006).

Dans le modèle cellulaire neuronal murin Neuro-2a (présenté au point 1.8), les travaux de Blondeau *et al.* (2016) ont montré que la déplétion de DLK (KD) effectué avec un système ARN interférant (ARNi; sh73) de manière transitoire affectait la croissance des neurites (figure 7 A). Lors de la différenciation neuronale induite pendant 24h, les cellules déplétées de DLK ont des neurites significativement plus courts que le contrôle (pLKO.1) (figure 7 B) (Blondeau *et al.*, 2016). De plus, selon les travaux de Hirai *et al.* (2011), la voie DLK/JNK favorise la stabilisation des microtubules et ainsi permet à la cellule neuronale du néocortex de former son axone. Lors de la différenciation, la cellule nerveuse traverse trois stades où la polarité de celle-ci change (figure 8 A). Les stades 2 et 3 seraient favorisés en partie par la régulation de la stabilité des microtubules, tandis qu'au contraire, la transition entre le stade 1 et 2 impliquerait des microtubules dynamiques (Hirai *et al.*, 2011). Cette étude a en plus démontré que la voie DLK/JNK est responsable de cette régulation (Hirai *et al.*, 2011). Les auteurs ont montré que JNK1 est impliqué dans le processus de différenciation neuronale (figure 8 B). Cependant, étant donné la synergie des doubles mutations de DLK et JNK1 (figure 8 B), les auteurs émettent des hypothèses, dont celle qu'une voie redondante alternative soit impliquée (Hirai *et al.*, 2011).

A



B

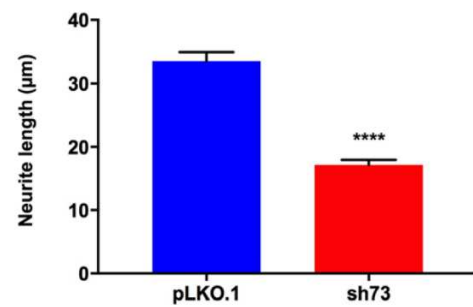


Figure 7. Effet phénotypique de la déplétion de DLK sur la différenciation des cellules Neuro-2a.

Image de Blondeau *et al.*, 2016. (A) Le contrôle négatif (pLKO.1) à gauche comparativement aux cellules déplétées (KD) de DLK (sh73) de façon transitoire. (B) Moyenne de la longueur des neurites mesurée dans 5 champs de vision pour chaque condition. La ligne blanche représente l'échelle de 50 μm . **** représente la valeur $p < 0.0001$, selon le *Student's test*.

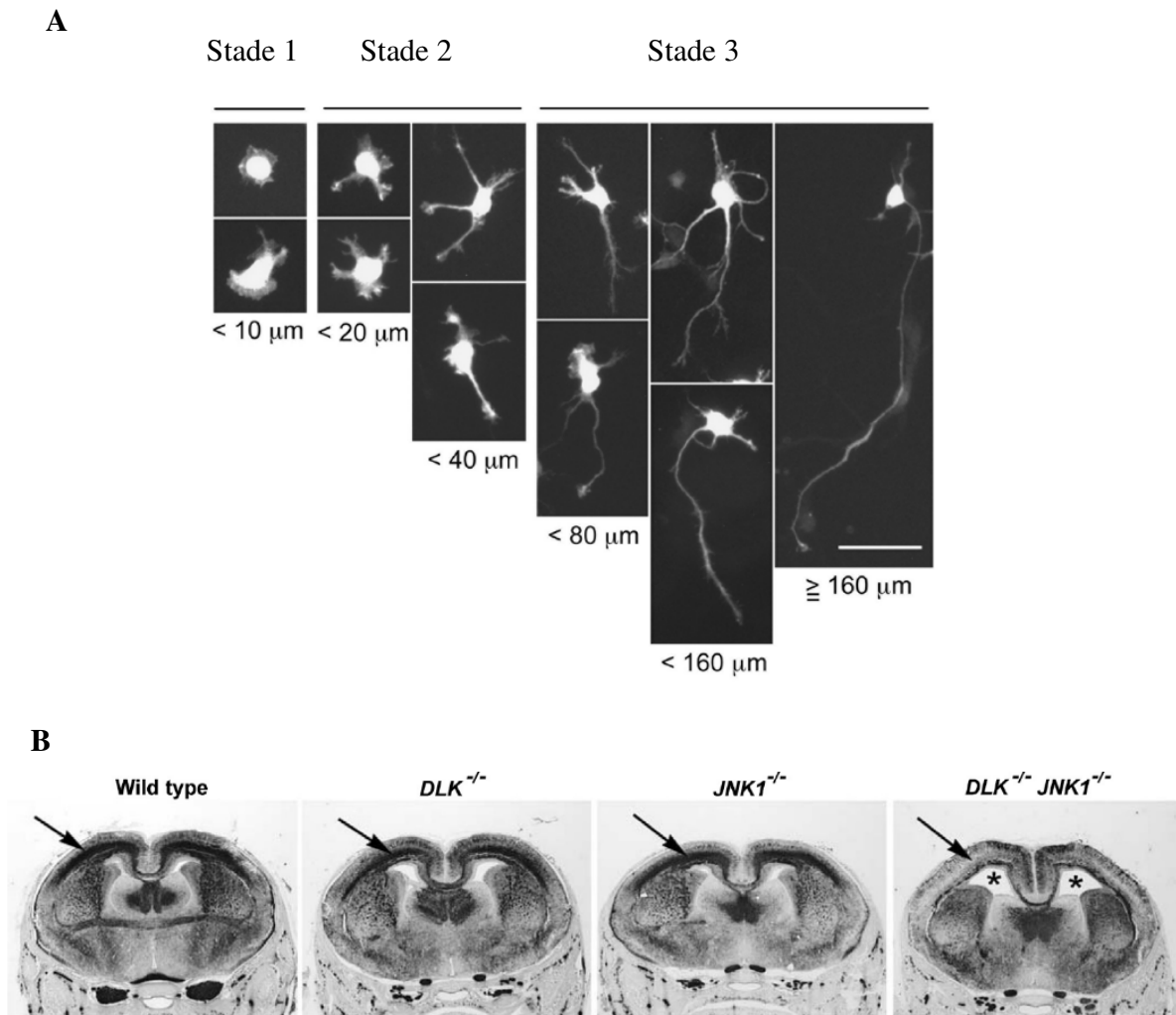


Figure 8. Différenciation des neurones du cortex cérébral murin.

Image de Hirai *et al.*, 2011. (A) Stades de la transition de la polarité cellulaire neuronale définis selon la longueur des neurites. Stade 1, non polaire; stade 2, multipolaire; stade 3, formation de l'axone. (B) Effet des mutations de DLK ou JNK1 sur le développement des axones. Image colorée avec un anticorps anti-neurofilament M. Coupe frontale d'un cerveau murin au 19^e jour embryonnaire. *Wild type*, type sauvage; $DLK^{-/-}$, mutant DLK homozygote; $JNK1^{-/-}$, mutant JNK1 homozygote; $DLK^{-/-} JNK1^{-/-}$, double mutant. Les flèches pointent en direction des axones du néocortex cérébral. L'astérisque représente l'endroit où les ventricules sont élargis dans le double mutant.

Donc, l'implication de DLK est essentielle au développement du SN et la voie DLK/JNK permet les réponses cellulaires de migration, de polarité cellulaire et de formation des axones (Hirai *et al.*, 2006 et 2011; Tedeschi et Bradke, 2013; Blondeau *et al.*, 2016).

1.5.3 DLK dans les situations de dommages aux neurones

Bien que la voie DLK/JNK puisse activer un processus biologique de régénérescence de l'axone, la neurodégénérescence peut malheureusement prendre parfois place après qu'une blessure ou un stress de type émotionnel, physique, thermique, électrique ou chimique ait été subi par le neurone (Miller *et al.*, 2009; Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng, 2019).

Selon la gravité du stress ou de la blessure, les réponses cellulaires peuvent varier. Il y aurait au moins deux formes de blessures que le neurone est en mesure de détecter de manière intrinsèque, soit celle liée à la démyélinisation de la fibre nerveuse et celle affectant le cytosquelette (Jin et Zheng, 2019). Les réponses varient aussi dépendamment de la localisation de la blessure et peuvent engager plusieurs voies de signalisation. Parfois, une voie peut en déclencher une autre et selon les types de stress DLK est souvent impliquée (Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng, 2019).

1.5.4 Fonctions de DLK en situation de stress et de blessures du SN

Les principales réponses neuronales dues aux stress ou aux blessures qui impliquent DLK sont la réponse à l'accumulation de protéines mal repliées, l'axotomie, la toxicité, le stress oxydatif, le retrait de facteur de croissance et les maladies neurodégénératives (Farley et Watkins, 2018). La voie illustrée précédemment (figure 5) peut être activée et soit provoquer la régénération et la survie ou la dégénérescence et l'apoptose du neurone. En plus, il existe le signal rétrograde qui permet de conduire le signal de l'axone vers le noyau et DLK est une composante majeure de ce signal. Le signal rétrograde se fait grâce à la formation du complexe protéique constitué de DLK et de plusieurs autres protéines, y compris JNK, qui dirige le signal vers le corps cellulaire pour ensuite le transmettre au noyau (figure 9) (Farley et Watkins, 2018).

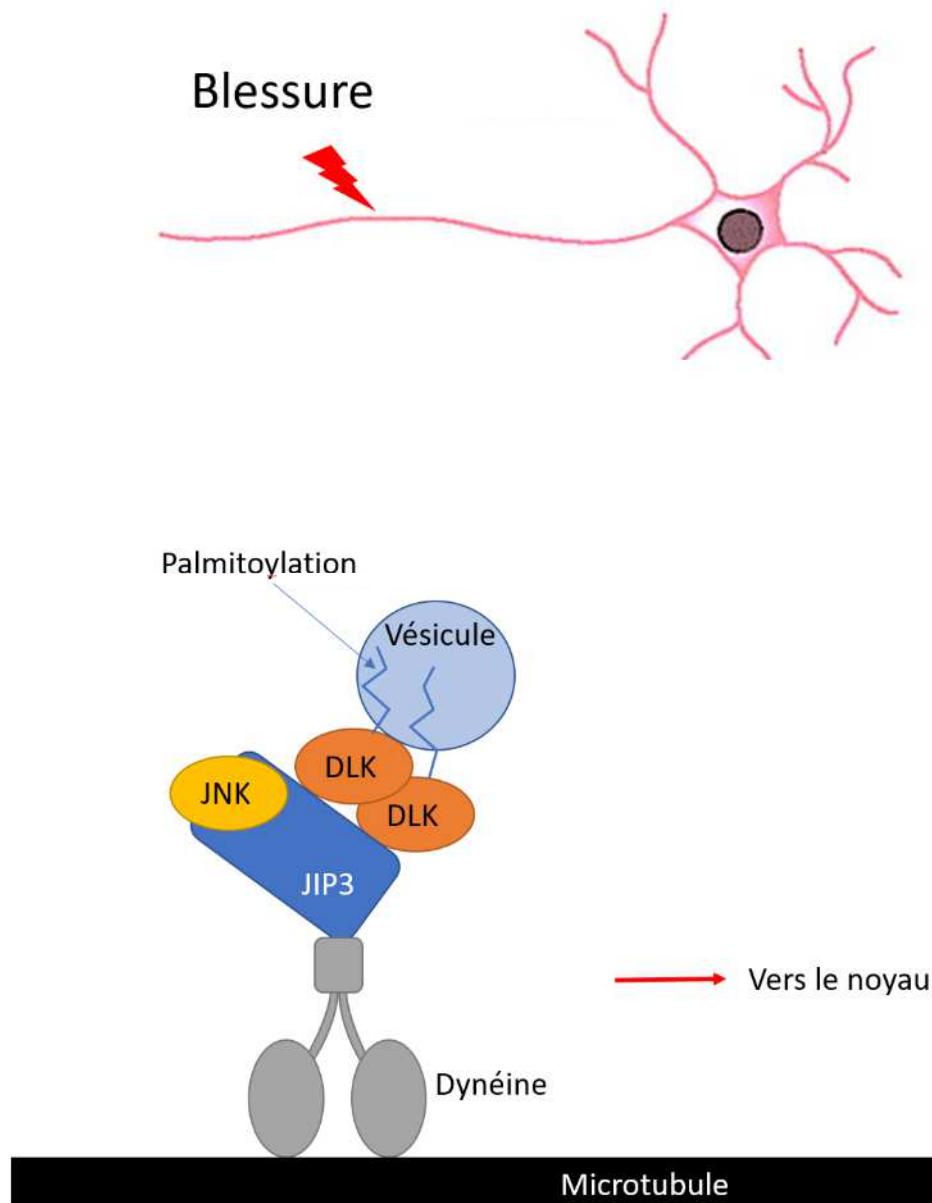


Figure 9. Complexe protéique permettant le signal rétrograde lors d'une blessure.

Image inspirée de Farley et Watkins, 2018. Lorsque le neurone subit une blessure au niveau de son axone, il y a un signal rétrograde qui permet au message de se rendre au noyau pour modifier la transcription des gènes. La palmitoylation de DLK facilite le transport des vésicules. JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; DLK, *Dual leucine zipper kinase*; JIP3, *JNK-interacting protein 3*.

1.5.5 Implication de DLK dans les maladies neurodégénératives

DLK est souvent étudiée dans le contexte des maladies du SNC, si bien que les recherches ont mené au développement d'inhibiteurs pharmacologiques (Oetjen et Lemcke, 2016; Larhammar *et al.*, 2017; Le Pichon *et al.*, 2017; Siu *et al.*, 2018). Ces inhibiteurs de DLK pourraient possiblement traiter les maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie de Parkinson (Ferraris *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2015; 2017; Siu *et al.*, 2018). Effectivement, contrairement à l'inhibition de DLK chez les fœtus qui provoque une létalité, dans les maladies neurodégénératives, l'inhibition de DLK a un effet protecteur (Le Pichon *et al.*, 2017). Effectivement, les travaux de Le Pichon *et al.*, (2017) indiquent que dans le SNC, la voie de DLK/JNK est activée tant chez les modèles murins que chez les humains lors des maladies de la SLA et de l'Alzheimer. Dans les modèles murins d'Alzheimer et de SLA, ces travaux ont montré que lorsque DLK est inhibée, ceci confère une protection neuronale (Le Pichon *et al.*, 2017). De plus, les travaux de Patel *et al.*, 2015, ont montré que la phosphorylation de c-Jun dans des modèles murin ALS SOD1 était directement affectée par l'inhibition pharmacologique de DLK avec les molécules GNE-8505 et GNE-3511 et ce, de manière dose dépendante.

En bref, en plus de son implication et contribution essentielle dans le développement, la voie DLK/JNK joue aussi paradoxalement un rôle majeur dans les maladies neurodégénératives (Hirai *et al.*, 2006 et 2011; Blondeau *et al.*, 2016; Le Pichon *et al.*, 2017; Farley et Watkins, 2018).

1.6 La protéine c-Jun : un facteur de transcription important de la voie DLK/JNK

Puisque que le facteur de transcription c-Jun est impliqué dans la régénérescence de l'axone, il serait possible qu'il soit aussi impliqué dans le développement de l'axone du neurone émergent (Tedeschi et Bradke, 2013). Étant un facteur de transcription important de la voie DLK/JNK, certains effets de c-Jun dans le neurone sont bien caractérisés, mais il en reste beaucoup à élucider (Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng, 2019).

La protéine c-Jun provient du gène *JUN*, mais la protéine a plusieurs synonymes tant chez l'humain que chez la souris. Ceux-ci sont JUN, *activator protein 1*, AP1, *transcriptor factor AP-1*, p39, *avian sarcoma virus 17 oncogene homolog* (v-Jun), en plus de AH119 et Jun A chez la souris. La protéine c-Jun contient un domaine bZip, c'est-à-dire une structure tirette à leucine qui permet sa dimérisation et un domaine basique riche lui permettant de se lier à l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Eferl et Wagner, 2003). Le complexe formé par c-Jun peut être un homodimère ou une multitude d'hétérodimères composés par quatre familles de protéines, dont celles des protéines JUN, FOS, ATF et *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (MAF) (Eferl et Wagner, 2003). Ce complexe se nomme AP-1. Il faut être prudent avec cette nomenclature, car bien qu'AP-1 (protéine activatrice 1) fait généralement référence aux dimères formés, comme mentionnés plus haut, la protéine c-Jun est aussi nommée ainsi. Chez les mammifères, bien que toutes les combinaisons soient possibles, les familles des protéines JUN et FOS sont les principales composantes du complexe AP-1 (Eferl et Wagner, 2003). La famille JUN regroupe 3 membres dont c-Jun, JunB et JunD, tandis que celle de FOS inclut 4 protéines dont c-Fos, FosB, *Fos-related antigen 1* (FOSL1) et FOSL2 (Eferl et Wagner, 2003). Pour les protéines de la famille ATF, il y a les composantes ATF-2, ATF-3, ATF-4, ATF-5, ATF-6, ATF-6B, ATF-7, *Basic leucine zipper transcriptional factor ATF-like* (BATF), BATF-2, BATF-3 et *Jun dimerization protein 2* (JDP2) (Shaulian et Karin, 2002; Eferl et Wagner, 2003). Enfin, Transcription factor Maf (c-MAF), *Transcription factor Maf A* (MAFA), MAFB, MAFF, MAFK et MAFK sont les protéines de la famille MAF qui peuvent former le complexe AP-1 (Shaulian et Karin, 2002; Eferl et Wagner, 2003).

Enfin, la région basique permet à c-Jun de se lier à une séquence spécifique de la chromatine selon le dimère formé. Effectivement, lorsqu'elle se dimérise selon c-Jun : c-Jun ou c-Jun : Fos, le complexe se lie généralement à la séquence de nucléotides 5'-TGA[C/G]TCA-3', aussi connue sous le nom d'élément de réponse 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Angel *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987). Lorsque le complexe AP-1 est formé des dimères c-Jun : ATF, le complexe peut se lier à la séquence 5'-TGA CN TCA-3', aussi connu sous le nom de *cAMP response element* (CRE) (Chatton *et al.*, 1994).

De plus, non seulement c-Jun peut réguler la transcription des gènes cibles selon les dimères formés, mais son activité transcriptionnelle peut aussi être régulée par la phosphorylation. Par exemple, dans son domaine de transactivation, il a longtemps été établi que deux sérines aux positions 63 et 73 ont la capacité d'être phosphorylées par les JNKs (Derijard *et al.*, 1994; May *et al.*, 1998). Donc, le facteur de transcription c-Jun régule la transcription des gènes cibles selon le dimère qu'il forme et selon son niveau de phosphorylation, entre autres. Alors, cette multitude de possibilités donne à c-Jun plusieurs propriétés fonctionnelles. Effectivement, selon la banque de données UniProt, c-Jun serait impliqué dans plus d'une cinquantaine de processus biologiques tant chez l'Homme que chez la souris. Aussi, toujours selon la même banque, c-Jun serait impliqué dans plus d'une vingtaine de fonctions moléculaires et la dérégulation de ce facteur de transcription ou du complexe AP-1 est de plus en plus associée à des problèmes de santé, dont les cancers, l'inflammation chronique et la neurodégénérescence (Johnson et Nakamura, 2007). Au départ, c-Jun et le complexe AP-1 étaient plutôt associés à l'activation de la transcription, d'où le nom du complexe, mais au fil du temps, il a été rapporté que c-Jun ou d'autres composantes ont la capacité d'inhiber la transcription de certains gènes (Eferl et Wagner, 2003). Par exemple, c-Jun a un effet inhibiteur sur la transcription des gènes *p53*, *WAF1* et *FAS* (Schreiber *et al.*, 1999; Shaulian *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2001) et JunB inhibe *Bcl2* et *Bcl-XL* (Passegue *et al.*, 2001). Enfin, spécifiquement au SN, les travaux de Parkinson *et al.* (2008) ont montré que c-Jun est inhibiteur de la myélinisation des cellules de Schwann. Alors, aux fins de simplification, la figure 10 illustre les principales composantes de la voie de signalisation DLK/JNK/c-Jun qui a fait l'objet du présent projet de recherche.

1.7 Hypothèse et objectifs du projet

Les travaux présentés dans ce mémoire visent donc à tester l'hypothèse que DLK contrôle la formation des neurites en régulant l'expression de gènes reconnus pour leur rôle clé dans ce processus. Pour y parvenir, le premier objectif était de construire un modèle cellulaire Neuro-2a où DLK est invalidée génétiquement (KO) avec le système *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats–CRISPR-associated protein 9* (CRISPR/Cas9). Ensuite, le deuxième objectif était de mesurer les conséquences du KO de DLK sur la croissance des neurites dans ce

modèle. Enfin, le troisième et dernier objectif était d'identifier des gènes dont l'expression est altérée dans le modèle Neuro-2a DLK KO en comparaison au contrôle.

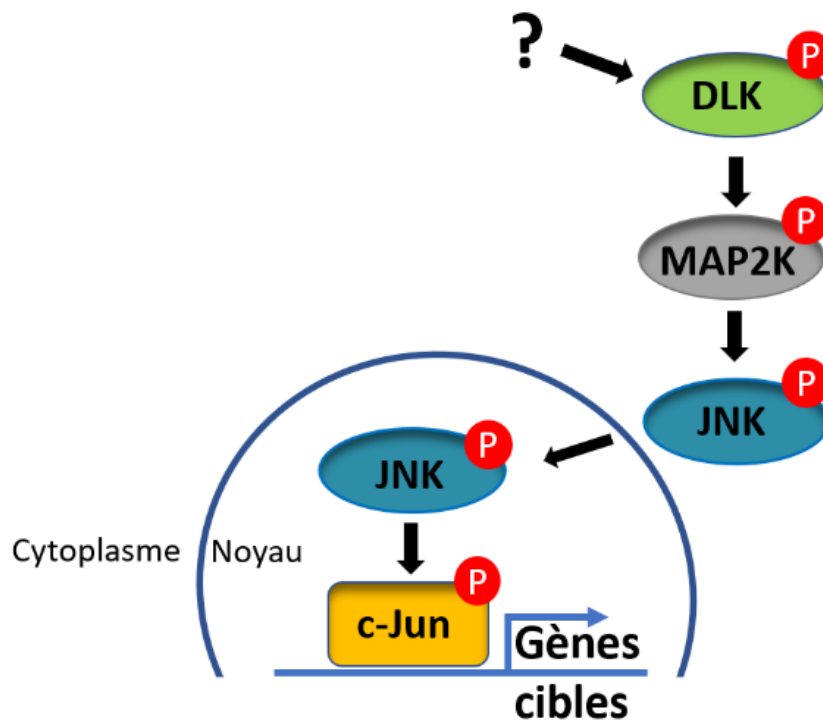


Figure 10. Voie de signalisation DLK/JNK investiguée dans les présents travaux.

DLK, *Dual leucine zipper kinase*; MAPK2 4/7, *Mitogen-activated protein kinase kinase 4 ou 7*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; c-Jun, *transcriptor factor AP-1*.

Les études impliquant DLK dans le développement du SN sont moins nombreuses que celles qui la mettent en cause dans les maladies neurodégénératives (Watkins *et al.*, 2013; Tedeschi et Bradke, 2013; Jin et Zheng). Alors, bien que DLK participe à la croissance axonale, les mécanismes régulant l'expression des gènes ne sont que partiellement élucidés. Ce projet permettra donc d'améliorer les connaissances sur la régulation des gènes par la voie DLK/JNK.

1.8 Modèle cellulaire Neuro-2a

Le modèle Neuro-2a provient d'un neuroblastome murin et il est constitué de cellules de type neuronal et amiboïde selon l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Dépendamment des conditions de culture, les cellules Neuro-2a ont la capacité de proliférer ou bien de se différencier en neurones (figure 11). Donc, les cellules Neuro-2a sont un bon modèle pour ce projet, car il permettra de caractériser l'impact de l'inactivation de DLK sur la croissance axonale.

Ces cellules prolifèrent dans un milieu de culture DMEM FBS 10% et ont la capacité de se différencier et d'acquérir des neurites lorsqu'elles sont en présence d'acide rétinoïque dans un milieu DMEM FBS 2%.

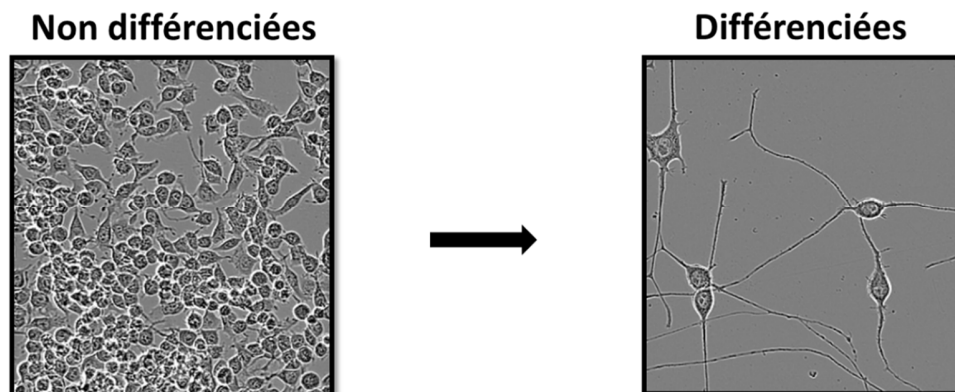


Figure 11. Morphologie des cellules Neuro-2a non différenciées et différenciées pendant 96 heures.

Les cellules non différenciées cultivées dans un milieu de culture DMEM FBS 10% sont en mode de prolifération. Les cellules se différencient lors d'une diminution de la concentration de FBS à 2% et en y ajoutant de l'acide rétinoïque (20 μ m).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation des plasmides

Les plasmides d'édition de gène du système CRISPR/Cas9 proviennent de la compagnie *Applied Biological Materials Inc.* (Abm) (tableau 1). Le système utilisé pour les présents travaux est celui d'un guide simple d'acide ribonucléique (sgARN) non traduit qui, avec la séquence *protospacer adjacent motif* (PAM) que l'enzyme reconnaît, cible un endroit spécifique sur le génome. Le sgARN est suivi d'un échafaud qui permet l'assemblage entre celui-ci et l'endonucléase Cas9, provenant de *Streptococcus pyogenes*. Cette endonucléase coupe l'ADN double brin. Tous les plasmides ont été amplifiés à partir de colonies bactériennes compétentes *Escherichia coli Stbl3™* (*ThermoFisher Scientific*) transformées selon le protocole d'Abm et sélectionnées à l'ampicilline 100 µg/ml. Pour valider l'insertion, les plasmides ont été récoltés, digérés et migrés sur gel d'agarose 1%. Ensuite, une maxi préparation plasmidique a été effectuée avec une trousse *Qiagen* (Cat #12163) selon le protocole inclus. Enfin, les plasmides CRISPR/cas9 ont été séquencés par la plateforme Séquençage et Génotypage des génomes du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL) avec l'amorce sens U6 : 5'-GAGGGCCTATT TCCCATGATTCC-3' d'Abm, fourni par le laboratoire du Dr Viktor Steimle. La spécificité des guides a été vérifiée à l'aide de l'outil en ligne de la compagnie *IDT* (https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE) et avec *CCTop* (Stemmer *et al.*, 2015).

Tableau 1. Liste des plasmides utilisant le système CRISPR/Cas9 (Abm).

| Vecteur | Nom du plasmide | Nom | Séquences cibles | # |
|--|--|----------|----------------------|--------------|
| pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro | Map3k12 sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-one Lentivector | 1 | GGGCGTCAGGTCTTTCTCGG | K379 8205 |
| | | 2 | TCTCGAAGTACACATTGGGT | |
| | | 3 | ATCTAGAGTTCGAGCTGATG | |
| | Scrambled sgRNA | Contrôle | GCACTCACATCGCTACATCA | K010 |

2.2 Conditions de culture cellulaire pour la prolifération et la différenciation

Les cellules Neuro-2a ont été cultivées à 37 °C à une atmosphère 5 % CO₂ dans un milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (*GIBCO BRL*, États-Unis) supplémenté de sérum bovin fœtal (FBS) (*GIBCO BRL*, États-Unis) à 10 %. Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu, soit la pénicilline (10 U/ml) et la streptomycine (10 µg/ml). Ces conditions sont celles utilisées pour favoriser la prolifération des cellules. Les passages cellulaires ont été faits aux trois ou quatre jours. Pour la différenciation, après 24 heures d'ensemencement, les cellules atteignant environ 60-70 % de confluence ont été rincées au tampon phosphate salin (PBS) 1X constitué de H₂KO₄P 1 mM, NaCl 137 mM et KCl 2.7 mM, pH 7,4, et incubées dans un milieu DMEM contenant 2 % de FBS et 20 µM d'acide rétinoïque selon le nombre d'heures indiquées pour chaque expérience. Lorsque non spécifié, le traitement est de 24 heures.

2.3 Production virale par transfection des cellules HEK293T

Les virus ont été obtenus en transfectant les plasmides d'intérêts dans les cellules *human embryonic kidney* 293 avec l'antigène T SV40 (HEK293T) ensemencées dans un pétri de 100 mm à 2 x 10⁶ cellules. Le jour suivant, 14 µg d'ADN plasmidique totale et 30 µl de polyéthylèneimine (PEI) à 1µg/µl ont été préparés dans 1 ml de DMEM et ajoutés aux cellules. La transfection contenait le plasmide d'une cible soit 1, 2, 3 ou contrôle (7 ug) (tableau 1), ainsi que les plasmides psPAX2 (5 ug) et pMD2G (2 ug) pour les composantes virales, fournis par le laboratoire du Dr Didier Trono de l'Université de Genève, Suisse. Le surnageant a été récolté après 48 à 72 heures et filtré avant d'être utilisé ou congelé à -80 °C.

2.4 Transduction et sélection des systèmes CRISPR/Cas9

Les cellules Neuro-2a ont été infectées par les virus d'intérêt avec un indice de multiplicité d'infection (MOI) de 8. Le MOI a été obtenu selon le protocole *Lentiviral titering by crystal violet staining* #V20718 de *Dharmacon™ Horizon Discover* (<https://horizondiscovery.com/-/media/Files/Horizon/resources/Protocols/titer-crystal-violet-protocol.pdf>).

Ensuite, le milieu de culture a été changé après 24 heures d'infection. La sélection à la puromycine à une concentration finale de 2 µg/ml a débuté au premier passage, soit de 72 à 96 heures après l'infection.

2.5 Production de lignées clonales CRISPR/Cas9 DLK

Après deux à trois passages avec sélection à la puromycine, les cellules infectées avec CRISPR-DLK B et le contrôle négatif D (tableau 1) ont étéensemencées à faible densité cellulaire afin de permettre la formation de colonies isolées. Après expansion d'un certain nombre d'entre elles, des analyses d'immunobuvardage sur des extraits protéiques provenant de ces cellules ont été effectuées pour vérifier la déplétion de DLK.

2.5.1 Extraction et amplification de l'ADN

L'invalidation génique (KO) de DLK dans les clones sélectionnés a été validée à la suite de l'extraction de l'ADN génomique et de l'amplification par PCR de la région cible. L'ADN a été récolté et purifié avec la trousse *DNeasy Blood and tissue* de *Qiagen* (#69504). L'ADN a été dilué 1 : 5 et 5 µl ont été utilisés pour l'amplification avec les amorces sens: 5'-CTTCAAGGAAGCCACTGCC -3', anti-sens: 5'-CCATGAAACCCGAACACCCT -3' et l'enzyme *TransStart® FastPfu DNA polymerase* (*TranGen Biotech Co*). Les échantillons ont été placés dans un thermocycleur pour une incubation de 2 minutes à 95 °C suivie de 32 cycles comprenant 20 secondes à 95 °C, 20 secondes à 57 °C et 20 secondes à 72 °C pour terminer avec 1 cycle de 5 minutes à 72 °C.

Ensuite, les amplicons ont été purifiés sur verre et séquencés avec la méthode Sanger par la plateforme du CHUL. Les résultats transmis ont d'abord été analysés avec l'outil *CRISPR-ID* (Dehairs *et al.*, 2016). Pour voir les effets des délétions sur la protéine et identifier le codon d'arrêt prématuré, l'outil *Translate* disponible sur *ExPASy Bioinformatics Resource Portal* a été utilisé.

2.6. Analyse protéique par immunobuvardage de type western

D'abord, les cellules cultivées en condition de prolifération ou de différenciation ont été récupérées après deux à six passages de sélection à la puromycine et culotées dans du PBS 1X. Les cellules placées sur glace ont été lysées dans un tampon constitué de SDS 0,2%, acide déoxycholate 0,5%, NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 7,4 15 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1 mM, β-mercaptoéthanol 10 mM, Triton X-100 1 %, aprotinine 1 µg/ml, leupeptine 1 µg/ml, PMSF 1 mM et Na₃VO₄ 0,2 mM. Les échantillons ont été mélangés pendant 1 heure à 4 °C et ensuite placés sur glace pour subir deux cycles de sonication de 10 secondes à faible intensité. Pour clarifier les lysats et concentrer les protéines, une centrifugation à 13 000 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes à 4 °C a été réalisée et le surnageant a été récupéré. La concentration protéique de chacun des extraits cellulaires a été déterminée par la méthode de Bradford. Une quantité fixe de protéines par échantillon a été préparée dans le tampon de Laemmli et chauffée pendant 5 minutes à 95 °C. Les échantillons ont été conservés à -20 °C.

Pour l'électrophorèse, 10 µg de protéines ont été déposés sur des gels SDS-PAGE de 8,5 % et migrés une heure à 150 volts dans un tampon Tris-glycine. Les marqueurs de poids moléculaire *Precision Plus Protein Standard Dual Color (Bio-Rad)* ont été utilisés pour suivre la migration des échantillons pendant l'électrophorèse et pour ensuite valider les protéines en fonction de leurs poids moléculaires attendus.

Les échantillons de protéines séparés par électrophorèse ont ensuite été transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylène (PVDF) en conditions semi-sèche avec l'appareil *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfert Cell (Bio-Rad)*. Les membranes ont été lavées dans un tampon contenant Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1% (TBS-T) avant d'être bloquées pour une heure dans la solution TBS-T supplémentée de lait 5 % pour les anticorps contre les protéines DLK, sémaphorine-6d (SEMA6D), HDAC2 et TBP ou de BSA 5% pour les anticorps contre c-Jun et sa forme phosphorylée à la position sérine 63 (S63). L'incubation des membranes avec les anticorps primaires (tableau 2) a été effectuée à 4 °C sur une plaque rotative pendant environ 18 heures. Au terme de l'incubation, les membranes ont été lavées à trois reprises dans

le TBS-T puis mise en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort pendant une heure à température ambiante (tableau 2). Après trois lavages dans le TSB-T, les membranes ont été incubées dans le réactif de chimiluminescence *Western Lightning® ECL Pro* (*PerkinElmer Inc*) pendant 5 minutes pour mettre en évidence la présence des protéines d'intérêt dans les échantillons.

Tableau 2. Liste des anticorps avec la concentration utilisée et leur provenance.

| Cible | Concentration | Provenance/ Espèce | Exposition |
|-----------------|---------------|---|---------------|
| Anti-IgG souris | 1 :10000 | <i>PerkinElmer Inc</i> #NEF822001EA Polyclonal chèvre | - |
| Anti-IgG lapin | 1 :10000 | <i>MilliporeSigma</i> #AP307P Polyclonal chèvre | - |
| c-Jun | 1 :1000 | <i>Cell signaling</i> #9165 Monoclonal lapin | 3 minutes |
| DLK | 1 :1000 | Laboratoire Blouin (Douziech <i>et al</i> , 1999) Polyclonal lapin | 10 secondes |
| HDAC2 | 1 :5000 | <i>Santa Cruz</i> #C-19 SC-6296/ Polyclonal lapin | 20 secondes |
| p-c-Jun S63 | 1 :1000 | <i>Cell signaling</i> #9261 Polyclonal lapin | 3 minutes |
| SEMA6D | 1 :1000 | <i>St John's Laboratory</i> #STJ192116 Polyclonal lapin | 5 minutes |
| TBP | 1 :5000 | <i>Abgent</i> #AM2196b/ Monoclonal souris | 5-10 secondes |

Pour la révélation, la technique sur films radiologiques de la compagnie *Progene* a été utilisée avec le révélateur et le fixateur de la compagnie *Carestream INDUSTREX*. Pour connaître les temps d'exposition pour chaque protéine, se référer au tableau 2. Chaque film a été révélé pendant 10 à 20 secondes et fixé pendant au minimum 1 minute. La quantification des films a été réalisée à l'aide du logiciel *Image Studio Lite*.

2.7 Caractérisation de la prolifération cellulaire et de la croissance des neurites

Au jour zéro, dans une plaque à 96 puits, 5×10^3 cellules ont étéensemencées par puits à raison de quatre puits par condition. Pour mesurer la prolifération, au jour un, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X, remises dans un milieu de culture DMEM supplémenté de FBS 10 % et introduites dans l'appareil *Incucyte® S3*. La confluence de chacun des puits a été évaluée pendant trois jours. La croissance des neurites a été mesurée à partir du même protocole, à l'exception de la diminution de la concentration de FBS à 2%, de l'ajout de l'acide rétinoïque $20 \mu\text{m}$ et de la durée d'observation qui s'est déroulée sur quatre jours. Les données produites ont été analysées par le même appareil, à l'aide des programmes de la confluence et du *neuro-track*. Les résultats découlent de quatre images par puit (n) pour un essai biologique (N).

Les graphiques et les statistiques ont été générés avec le logiciel *Prism-GraphPad* version 7.04. D'abord, une analyse simple de la variance (*one-way ANOVA*) a été conduite suivi d'une analyse *Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli*, qui tient compte du taux de fausse découverte (*False Discovery Rate adjusted p-value*), pour valider que les résultats étaient significatifs ou non.

2.8 Détermination des gènes à l'étude

Des gènes potentiellement régulés par la voie DLK/JNK ont été sélectionnés à partir des résultats préliminaires d'une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage à haut débit (ChIP-seq) qui a été réalisé par Guillaume St-Cyr du laboratoire Blouin avec un anticorps spécifique dirigé contre la protéine c-Jun. L'anticorps utilisé provient de la compagnie Abcam (ab32137-E254) et il est validé pour la technique ChIP. Le principe de la technique ChIP-seq est bien détaillé dans les travaux de Mundade *et al.* (2014). Le ChIP-seq a été effectué sur deux lignées stables de cellules Neuro-2a, dont une qui n'exprime que le vecteur vide (pLKO.1), donc sert de contrôle négatif et une autre, où les cellules sont déplétées de DLK par ARNi avec un shARN (sh73) précédemment décrit (Blondeau *et al.*, 2016). Les résultats préliminaires ont permis d'identifier des gènes où l'enrichissement de la protéine c-Jun sur la

chromatine variait entre les deux lignées cellulaires stables en différenciation. L'analyse *Gene Ontology* (GO) a permis d'identifier des gènes reliés, au comportement, à la mémoire, à la morphogenèse et à la différenciation neuronale. Alors, les gènes étudiés dans ce projet sont ceux qui sont d'abord ressortis dans des groupes fonctionnels (*clusters*) de la GO où il était possible d'observer un phénotype avec les cellules Neuro-2a et qui sont aussi exprimés fortement dans les Neuro-2a, selon des données de transcriptomique du laboratoire Blouin (Blondeau *et al.*, 2016). En outre, les gènes sélectionnés devaient avoir une forme d'enrichissement de la protéine c-Jun à la chromatine visuellement intéressante, comme le suggère Mundade *et al.* (2014) et posséder des motifs que cette protéine reconnaît, ce qui a été vérifié à l'aide d'*Algene Promo* (Messegueur *et al.*, 2002; Farré *et al.*, 2003).

2.9 Analyse de l'ARNm par rt-qPCR

D'abord, les extraits d'ARN ont été récoltés à partir des cellules selon le protocole de la trousse d'extraction d'ARN *EZ-10 RNA Mini-Preps Kits* (Bio Basic inc. #BS88583). L'ARN a ensuite été quantifié à l'aide de l'appareil spectrophotomètre *Nanodrop*. Les échantillons ont été conservés à -80 °C pour une analyse subséquente ou bien laissés sur glace afin de poursuivre.

L'ADNc a été obtenu selon le protocole du laboratoire Gévry. Dans un premier temps, 600 ng d'ARN et 1 ul d'hexamères aléatoires, servant éventuellement d'amorces, dilués à 0,5 µg/µl ont été mélangés dans de l'eau stérile (volume total de 8 ul) et placés dans le thermocycleur pour être chauffés à 70 °C pendant 5 minutes. Puis, pour convertir l'ARN en ADNc, 40 unités de transcriptase inverse M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (*Enzymatics*), son tampon et des désoxynucléotides triphosphate (dNTPs) 10 mM y ont été ajoutés. Les échantillons ont par la suite été placés au thermocycleur pour 1 heure à 37 °C, suivi de 15 minutes à 70 °C pour dénaturer l'enzyme.

Une courbe standard a été conçue à partir de l'ADNc du contrôle négatif. Celle-ci contenait les dilutions 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 et 1 : 32 tandis que tous les échantillons ont été dilués à 1 : 8. Pour l'essai, deux contrôles négatifs ont été placés, soit un pour la courbe standard et un pour les

échantillons de chacun des gènes testés. Quatre gènes contrôles internes ont été utilisés, soit *Tbp*, *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (Rplp0)*, *Zinc finger MYND-type containing 8 (Zmynd8)* et *Autophagy related 7 (Atg7)*. Tous les échantillons et les courbes standards ont été testés en triplicatas techniques (n=3) et l'analyse complète contient 4 essais biologiques (N=4). La solution permettant la réalisation du q-PCR a été élaborée par le laboratoire Gévry. L'enzyme polymérase *Taq it (Enzymatics)* a été utilisé à raison de 0,8 unité par échantillon. Les amorces ont été conçues et vérifiées avec le logiciel *Primer-Blast* du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) et avec l'outil *In-Silico PCR* de *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), respectivement (tableau 3). Les amorces *Tbp* et *Rplp0* ont été conçues par des étudiants du laboratoire Gévry. Toutes les amorces proviennent de *IDT*, à l'exception de celles du gène *Tbp* qui proviennent de *Sigma-Aldrich*. Avec la courbe standard, les amorces ont d'abord été testées pour vérifier le taux d'efficacité et leur spécificité. L'efficacité des oligos doit se situer entre 90% et 110%, mais plus l'écart de l'efficacité entre ceux-ci est petit, plus les résultats sont fiables. Enfin, l'appareil *CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)* a servi pour la quantification avec le programme d'un cycle de 3 minutes à 95 °C suivis de 35 cycles à 95 °C pendant 10 secondes et 30 secondes à 60 °C.

Tableau 3. Amorces utilisées en fonction des gènes étudiés par rt-qPCR.

| Gènes | Amorces sens 5'--3' | Amorces anti-sens 5'--3' |
|---------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>Abl2</i> | AACCTAGATGGGGGCCTTGA | TTCTAATGAACCCTGCTGGTGC |
| <i>Atg7</i> | CACCCAAAGACATCAAGGGC | GAGGCACTCATGTCAAAAGCA |
| <i>Etv4</i> | CAGACTTCGCCTACGACTCA | TAGCCATAACCCATCACTCCATC |
| <i>Igf1r</i> | GTTGCCATCCTGCTGATCGT | TTCATCAGGCACGTACACATC |
| <i>Ncam1</i> | TGAGTTCAAGACACAGCCAGT | ACCTTGATGGAGTTCCCGTC |
| <i>Rab21</i> | CCGCTAAACAGAACAAAGGCA | CAGTTAGCCGGAGGAACAGC |
| <i>Rplp0</i> | CGTCCTCGTTGGAGTGACAT | TAGTTGGACTTCCAGGTTCGC |
| <i>Sema6d</i> | TATTGCTGGCAGGGATCAAG | TTTCTCGATCCTGCTGTCTGG |
| <i>Tbp</i> | CAGGCGTTCGGTGGATC | CGTCCTTCAATGTTCTGGGTTATC |
| <i>Zmynd8</i> | GTGAGCCCTGTAGCAATCCG | TTTCGCTGGCCAGAATGGAA |

Les résultats ont ensuite été analysés selon la plateforme génomique de l'Université de Montréal (https://genomique.irc.ca/resources/files/Understanding_qPCR_results.pdf). Le calcul final de la quantification de l'expression relative (QR), qui représente le *fold change*, a été déterminé selon la formule présentée.

$$QR = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (\text{équation 2.1})$$

Le CT est la valeur du cycle où la courbe du PCR croise le seuil. Le symbole Δ se nomme delta. Avant d'en arriver au calcul final, il faut d'abord vérifier la variance des résultats selon ΔCT , qui est calculé par le logiciel *CFX Manager* (Bio-Rad). Pour s'assurer de la qualité des résultats, cette valeur doit se situer en dessous de 0,25. Celle-ci est déterminée en tenant compte des valeurs des triplicatas techniques tant pour les gènes étudiés que pour les gènes servant de contrôle interne pour chaque échantillon. De plus, une autre valeur calculée par le logiciel est celle de la moyenne de la variance des gènes de contrôle interne (M value) pour tous les essais. Cette valeur indique que les gènes de contrôle interne sont stables entre les expériences et celle-ci doit être inférieure à 0,5. Lorsque ces deux valeurs sont conformes, la quantification avec le QR est possible, car les valeurs sont fiables. Voici les équations qui permettant d'effectuer les calculs.

$$\Delta CT = CT_{\text{gène}} - CT_{\text{contrôle interne}} \quad (\text{équation 2.2})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{échantillon}} - \Delta CT_{\text{contrôle négatif}} \quad (\text{équation 2.3})$$

Les graphiques et les statistiques ont été réalisés avec le logiciel *Prism-GraphPad* version 7.04. D'abord, une analyse simple de la variance (*one-way ANOVA*) a été conduite suivie du test de *Sidak's multiple comparisons test* pour s'assurer que les résultats étaient significatifs ou non.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Présentation générale du projet réalisé

Ce projet avait comme but principal de tester l'hypothèse que DLK contrôle une partie de l'axonogenèse dans les neurones en régulant l'expression des gènes clefs participants à ce processus. Pour atteindre cet objectif, le modèle cellulaire Neuro-2a (point 1.8) a été utilisé pour sa capacité à se différencier en neurone et donc, à former des neurites. Ceux-ci sont des prolongements qui émergent du corps cellulaire lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions qui favorisent la différenciation (point 2.2), c'est-à-dire dans un milieu en présence d'acide rétinoïque (20 μ M) et d'une faible concentration de sérum (FBS 2%). Les neurites sont les précurseurs des dendrites et de l'axone, qui se développent lorsque des signaux sont reçus par la cellule et que des changements biochimiques intracellulaires se manifestent enfin par des changements morphologiques.

Donc, à partir de ces cellules, le premier objectif du projet était de construire des lignées clonales stables de Neuro-2a où la protéine DLK ne serait plus exprimée au moyen du système CRISPR/Cas9 (point 2.1). Les lignées cellulaires obtenues ont ensuite fait l'objet d'une validation par immunobuvardage et par séquençage du gène afin de confirmer l'invalidation génique de *Dlk* (KO) dans celles-ci. Ensuite, la caractérisation du phénotype de la différenciation ainsi que celui de la prolifération dans ces lignées clonales a été réalisée pour s'assurer que les modèles répondaient similairement à ce qui est connu dans la littérature et aux observations déjà faites dans le laboratoire. Enfin, l'expression de certains gènes régulant l'axonogenèse a pu être examiné dans les deux lignées clonales stables Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO et le contrôle. Cet objectif s'est concrétisé sur la base de résultats préliminaires d'une analyse ChIP-seq du facteur de transcription c-Jun, fait par Guillaume St-Cyr du laboratoire Blouin, dans une lignée Neuro-2a déplétée en DLK par ARN interférence (KD). Les étapes majeures du présent projet de recherche sont illustrées à la page suivante (figure 12).

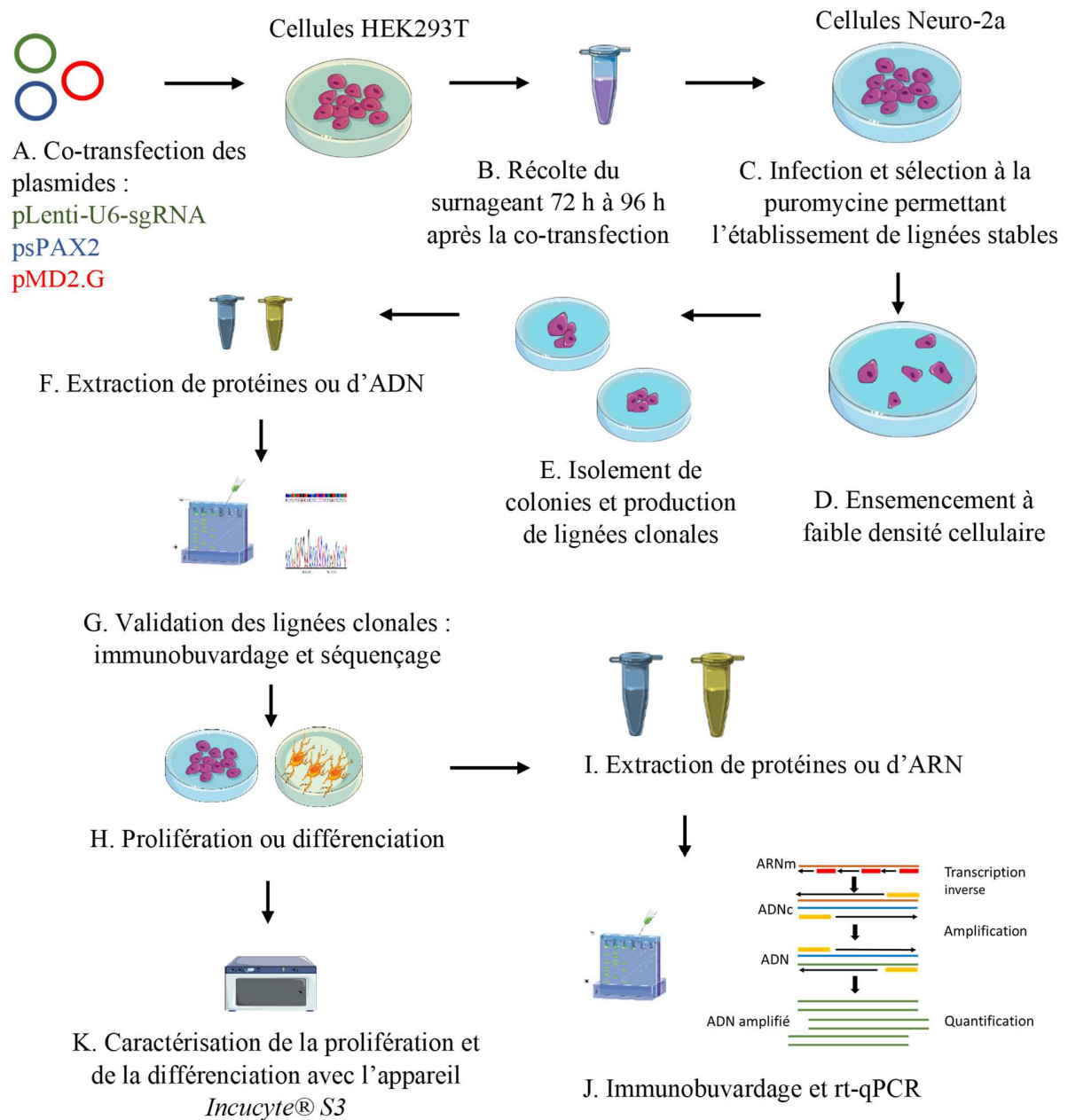


Figure 12. Représentation schématique du plan de travail réalisé au cours du projet.

Images créées avec les icônes de *Servier Medical ART*.

3.2 Établissement d'un modèle de cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO

D'abord, les trois plasmides contenant les ARN guides ciblant spécifiquement *Dlk* ainsi que l'enzyme du système CRISPR/Cas9 (point 2.2) ont été introduits dans les cellules Neuro-2a par lentivirus (figure 12 A et B). Les cellules ont ensuite été sélectionnées à la puromycine (figure 12 C). Après l'obtention de populations cellulaires résistantes à l'antibiotique, des analyses par immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre la protéine DLK ont été effectuées pour évaluer l'efficacité du système et déterminer lequel des ARN guides s'avérait le plus apte à inhiber son expression.

Comme l'illustre la figure 13 A, les résultats indiquent que l'abondance de DLK est réduite à des niveaux plus au moins variables dans les trois populations cellulaires en comparaison avec le contrôle négatif et le contrôle de chargement HDAC2. Alors, puisque l'ARN guide 2 offrait la meilleure spécificité au gène de *Dlk* (point 2.1), des lignées de cellules dérivant de cette population ont ensuite été produites en favorisant la formation de colonies résultant d'un ensemencement à faible densité (figure 12 D). Par la suite, les colonies isolées ont été récoltées et l'expansion de celles-ci a permis d'établir un modèle d'étude n'exprimant plus la protéine DLK (KO) (figure 12 E, F et G). Ces lignées, désignées clone 1 et clone 2, ont un niveau d'expression de DLK indétectable comme en témoignent les résultats d'immunobuvardage présentés à la figure 13 B. La diminution ou l'absence de la protéine DLK dans ces cellules s'accompagne d'une réduction de la quantité du facteur de transcription c-Jun et de sa forme phosphorylée à la position S63 en réponse à la différenciation induite par un traitement à l'acide rétinoïque (figure 13 B). Parallèlement à cette analyse, l'ADN génomique de ces clones a été isolé et séquencé en partie afin de déterminer quel impact l'ARN guide 2 a eu sur l'intégrité du gène DLK (figure 12 F et G). Les résultats présentés à la figure 14 montrent que les deux clones sélectionnés ont des délétions variant de 8 à 37 paires de bases dans le premier exon traduit du gène DLK ciblé par l'ARN guide. Ces délétions, qui touchent les trois variants possibles chez la souris (point 1.5), conduisent à un changement du cadre de lecture et donc, à l'introduction d'un codon d'arrêt dans le même exon, ce qui produit vraisemblablement la perte de son expression au niveau protéique.

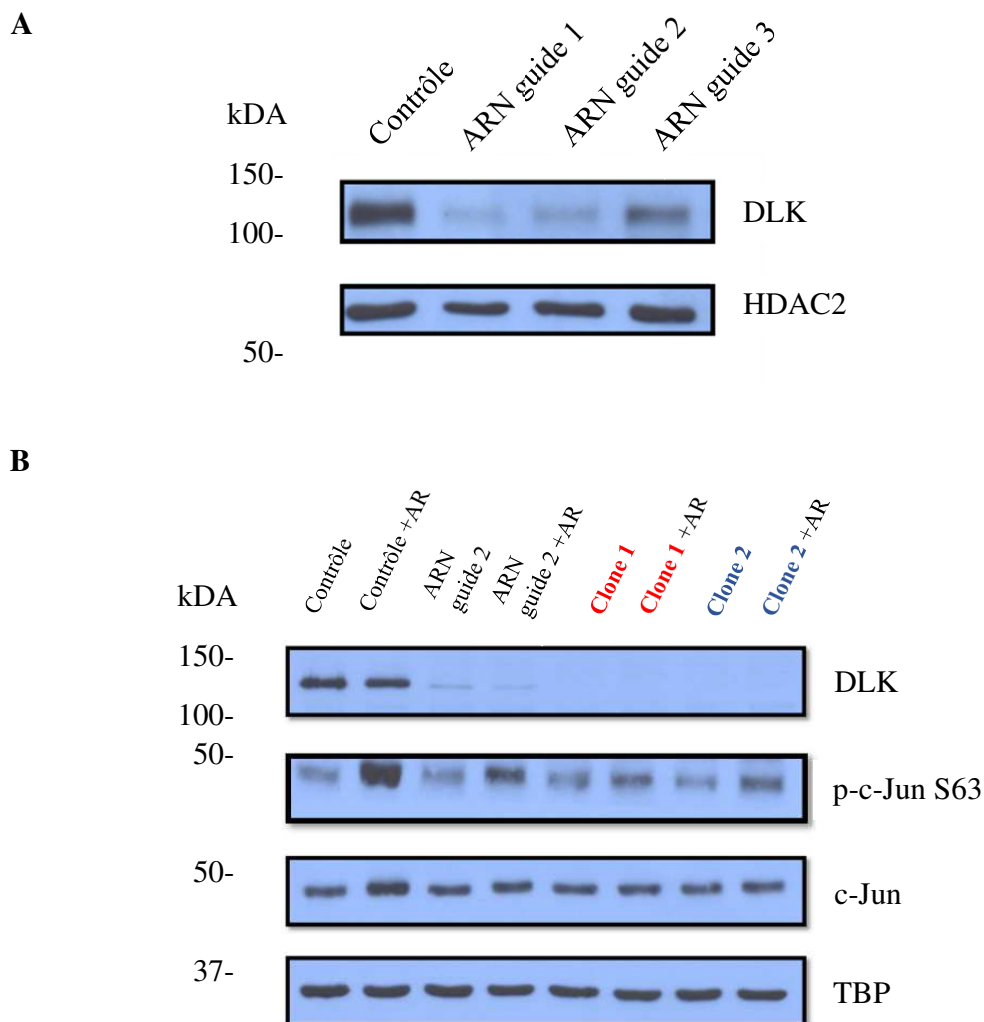


Figure 13. Déplétion de DLK dans les cellules Neuro-2a.

(A) Détection de DLK par immunobuvardage dans les extraits protéiques des populations cellulaires exprimant l'un des 3 ARN guides et le contrôle avec un anticorps anti-DLK ainsi que le contrôle de chargement HDAC2. (B) Analyse par immunobuvardage de l'abondance des protéines DLK, p-c-Jun S63, c-Jun avec le contrôle TBP dans les cellules de la population de la cible 2 et des lignées clonales Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO et le contrôle, avant et après traitement à l'acide rétinoïque. DLK, *Dual leucine zipper kinase*; HDAC2, *Histone deacetylase 2*; p-c-Jun, phospho-c-Jun; TBP, *TATA binding protein*. +AR, conditions différenciées.

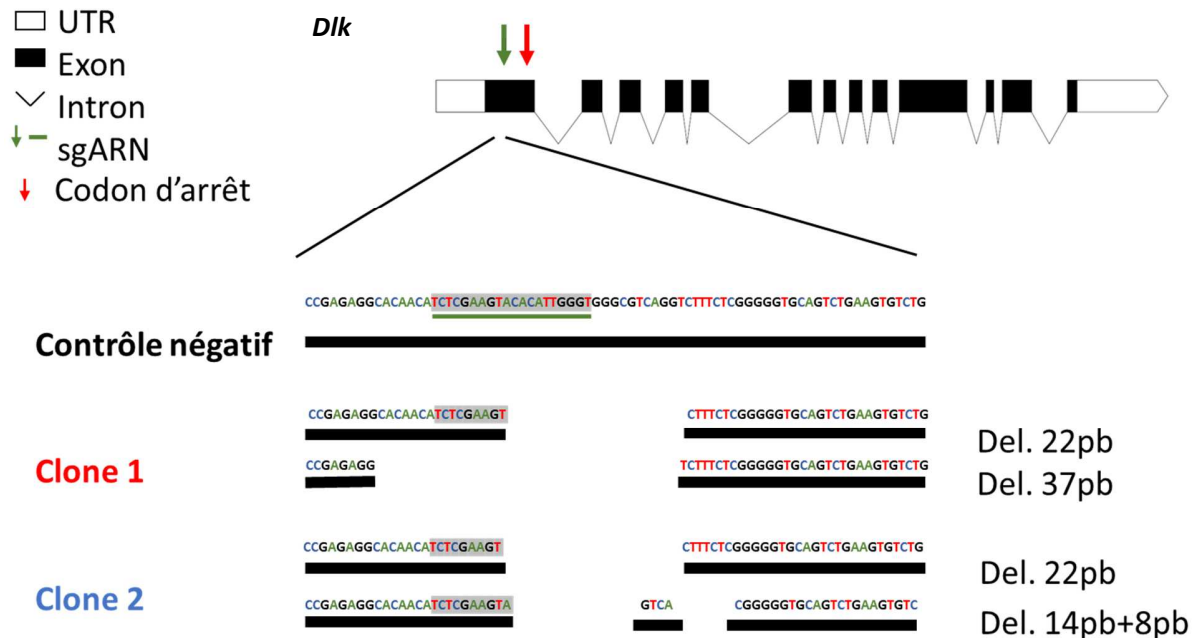


Figure 14. Invalidation génique de *Dlk* dans les cellules Neuro-2a.

Analyse de la séquence d'une portion de l'exon du gène *Dlk* ciblé par l'ARN guide 2 dans les lignées clonales DLK KO en comparaison au contrôle. La flèche et la ligne verte représentent respectivement la position et la séquence de l'exon ciblé par l'ARN guide 2 sur le gène, alors que la flèche rouge indique l'endroit où un codon d'arrêt prématuré est survenu dû à un changement du cadre de lecture provoqué par la délétion d'une partie du gène. UTR, régions non traduites; Del., Délétion; pb, paires de bases.

3.3 Phénotype des lignées clonales stables

Afin de valider le comportement des Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO, les clones ainsi que leur contrôle ont d'abord été examinés dans des conditions de différenciation, selon la méthode détaillée au point 2.7, pour s'assurer que le phénotype engendré était compatible avec les données de la littérature ainsi que celles du laboratoire Blouin (figure 12 H et K). La conséquence de l'invalidation génique de DLK attendue était de ralentir la croissance des neurites en comparaison au contrôle (Blondeau *et al.*, 2016; Tedeschi et Bradke, 2013; Hirai *et*

al., 2011). L'appareil *Incucyte® S3* a permis de récolter les données en prenant quatre clichés photographiques par puits et ensuite, de les analyser avec les programmes intégrés soit le *neuro-track* et la confluence cellulaire. Le deuxième programme a été choisi pour tenter d'évaluer l'effet de l'absence de DLK sur la prolifération. Dans la littérature, la déplétion de DLK confère des effets protecteurs sur les cellules neuronales et ralentit le taux de prolifération dans plusieurs types cellulaires (Le Pichon *et al.*, 2017 ; Ghosh *et al.* 2011; Itoh *et al.*, 2011; Daviau *et al.*, 2011; Tenenbaum *et al.*, 2020). Alors, pour valider les attentes vis-à-vis du modèle cellulaire Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO, chaque essai biologique contenait quatre puits par condition. L'évaluation de la confluence cellulaire et de la croissance des neurites a fait l'objet de deux et trois essais biologiques respectivement.

Puisqu'il importe d'avoir un modèle qui répond bien aux attentes afin qu'en découlent ensuite des résultats fiables, les conséquences morphologiques sur les neurites provoquées par l'absence de DLK ont d'abord été examinées dans des conditions de différenciation. Comme attendu, dans ces conditions, les cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO en comparaison avec leur contrôle, montrent des changements phénotypiques au niveau de l'organisation du réseau et de la longueur des neurites (figure 15 A et B). Ces résultats sont en accord avec les précédents du laboratoire, où ceux-ci sont présentés dans les travaux de Blondeau *et al.* (2016) introduits au point 1.5.2. Dans cet article, un modèle Neuro-2a DLK KD a clairement montré un retard de croissance des neurites comparativement à leur contrôle. De plus, les résultats sont en accord avec ceux d'Hirai *et al.* (2011), où il a été montré dans un modèle murin que l'absence de DLK *in vivo* réduisait la longueur des neurites les plus longs des neurones du néocortex cérébral (point 1.5.2). Enfin, du côté des cellules neuroblastiques provenant d'un phéochromocytome de rat (PC12), la déplétion de DLK engendre aussi un problème d'élongation des axones (Eto *et al.*, 2009).

Donc, comme on pouvait s'y attendre, à partir de la deuxième journée il est possible d'observer une tendance et à la troisième journée de différenciation, la longueur des neurites en millimètre (mm) par mm de surface (mm²) est significativement plus courte dans les clones DLK KO que dans le contrôle négatif (figure 15 B). Au troisième jour, la différence est d'environ 4 mm/mm²

entre le contrôle et les lignées clonales et passe aux alentours de 5 mm/mm² à la quatrième journée de différenciation (figure 15 B). Les lignées clonales se comportent de la même façon, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence significative entre elles (figure 15 B). Donc, ces résultats sont conformes aux précédents travaux du laboratoire ainsi qu'avec ceux de la littérature où il a été démontré que DLK régule la croissance des neurites et des axones (point 1.5.2) (Eto *et al.*, 2009; Hirai *et al.*, 2011; Tedeschi et Bradke, 2013; Blondeau *et al.*, 2016; Jin et Zheng, 2019).

Les clichés photographiques faits à partir de l'appareil *Incucyte® S3* ont permis d'observer la différence morphologique entre les lignées cellulaires (figure 15 A). Dans l'image du contrôle, il est possible de visualiser un réseau de neurites plus complet et dense que celui des clones. Effectivement, les prolongements en rejoignent un autre ou bien ils atteignent un autre corps cellulaire (figure 15 B). Quant à eux, les clones se caractérisent par un réseau de neurites affecté. Donc, tant les mesures que les images représentent bien le phénotype attendu lorsque la kinase DLK est absente dans les cellules neuronales (figure 15 A et B).

À la figure 15 C, il est possible de constater que l'invalidation de DLK n'affecte pas la confluence cellulaire. Effectivement, lorsque les cellules sont observées dans des conditions de prolifération, il n'y a aucune différence de confluence cellulaire dans le temps entre les clones et le contrôle (figure 15 C). À ce stade, il faut considérer que même si les résultats sont tels, des mécanismes moléculaires possiblement engendrés par l'absence de DLK pourraient influencer la prolifération cellulaire, mais que ceux-ci soient indétectables avec la méthode utilisée ici. Dans la littérature, DLK a souvent été caractérisée pour jouer un rôle dans la prolifération cellulaire (Kowalczyk, *et al.*, 2004; Daviau *et al.*, 2011; Lukaszewics *et al.*, 2011; Tenenbaum *et al.*, 2020). Donc, les présents résultats permettent seulement de conclure que la population cellulaire totale reste stable au fil du temps, mais qu'il est possible que le taux de régénération cellulaire soit différent entre le contrôle et les lignées cellulaires clonales. De plus, d'autres essais biologiques seraient nécessaires pour confirmer que cette similitude reste la même sur un plus grand nombre d'échantillons.

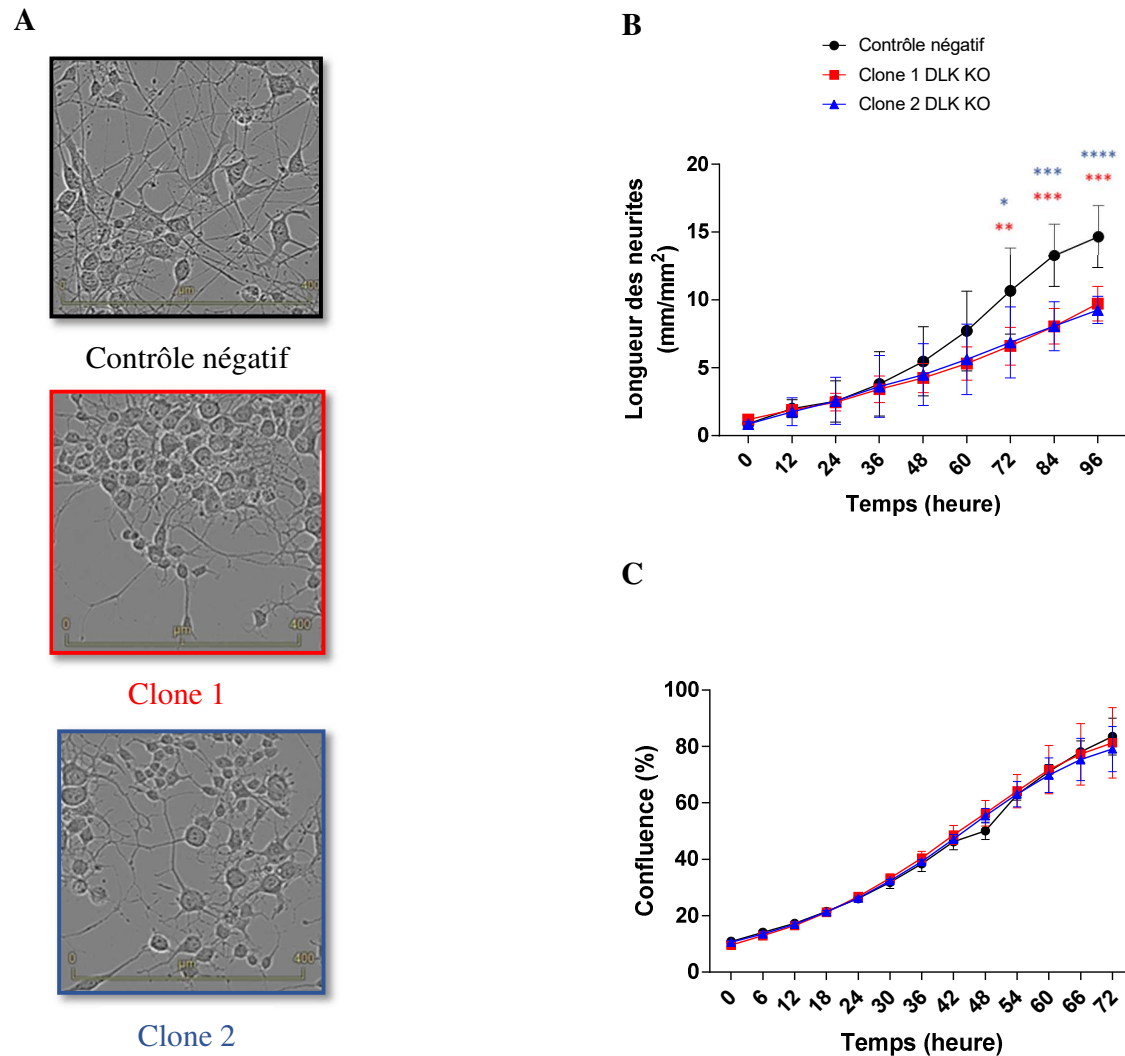


Figure 15. Caractérisation phénotypique des cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO.

(A) Aspect morphologique des cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 différenciées. Les cellules sont incubées depuis 96h dans un milieu contenant 20 μ M d'acide rétinoïque et 2% FBS. Échelle 0-400 μ m. (B) Longueur des neurites exprimée en mm/mm² dans le temps selon la lignée cellulaire (N=3, n=4). (C) Mesure de la confluence cellulaire exprimée en % dans le temps selon la lignée cellulaire. (N=2, n=4). Réalisée avec l'appareil *Incucyte® S3*. Noir, contrôle négatif; Rouge, lignée clonale 1; Bleu, lignée clonale 2. N; essai biologique, n; réplica technique. Les astérisques représentent la valeur p, *<0,05; **<0,01; ***<0,002; ****<0,001. Statistiques réalisées avec la méthode *Two-stage linear step-up procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli*.

3.4 Évaluation de l'expression des gènes ciblés ayant un rôle à jouer dans la neurogenèse

À partir de travaux préliminaires effectués par Guillaume St-Cyr du laboratoire Blouin dans un modèle cellulaire Neuro-2a shARN-DLK, des régions de la chromatine appauvries par le facteur de transcription c-Jun en condition différenciée pendant 24 heures en comparaison au contrôle ont été ciblées (figure 16). Quelques résultats de cette analyse sont montrés à la figure 16, dont celui du facteur c-Jun qui s'auto-régule lui-même et qui est activé par la voie DLK/JNK (figure 16 A) (Angel *et al.*, 1988; Tedeschi et Bradke, 2013).

Malgré le fait que les résultats soient préliminaires et que l'essai ait été réalisé dans un modèle de cellules Neuro-2a différent de celui établi dans ce projet, la diminution de l'enrichissement de c-Jun sur son propre gène en conditions différenciées lorsque DLK est déplétée, montré à la figure 16 A, corrèle bien avec les résultats d'immunobuvardage de la figure 13 B, ainsi qu'avec ceux de la littérature (Angel *et al.*, 1988; Tedeschi et Bradke, 2013).

La figure 16 B atteste que le motif d'enrichissement pour le gène *sema6d* est complètement différent entre les deux modèles cellulaires. De façon intéressante, le gène *Insulin like growth factor 1 receptor (Igf1r)* est identifié deux fois au moyen de l'analyse et les motifs présentent une inversion d'enrichissement (figure 16 C). Enfin, le gène *ETS Variant Transcription Factor 4 (Etv4)*, présente aussi deux motifs d'enrichissement dont un est presque absent sur le modèle shARN DLK, comparativement au contrôle, tandis que l'autre ne change pas significativement (figure 16 D).

À partir des données traitées du ChIP-seq, les gènes qui ont montré une différence significative du motif d'enrichissement entre les deux lignées cellulaires ont été regroupés selon les processus biologiques pour lesquels ils sont reconnus et communs entre les espèces. Cette analyse ontologique (GO) a permis de recenser plusieurs gènes en lien avec le développement et le fonctionnement du SN (tableau 4). Plusieurs groupes fonctionnels de gènes (*clusters*) en sont ressortis, dont cinq d'entre eux sont présentés au tableau 4.

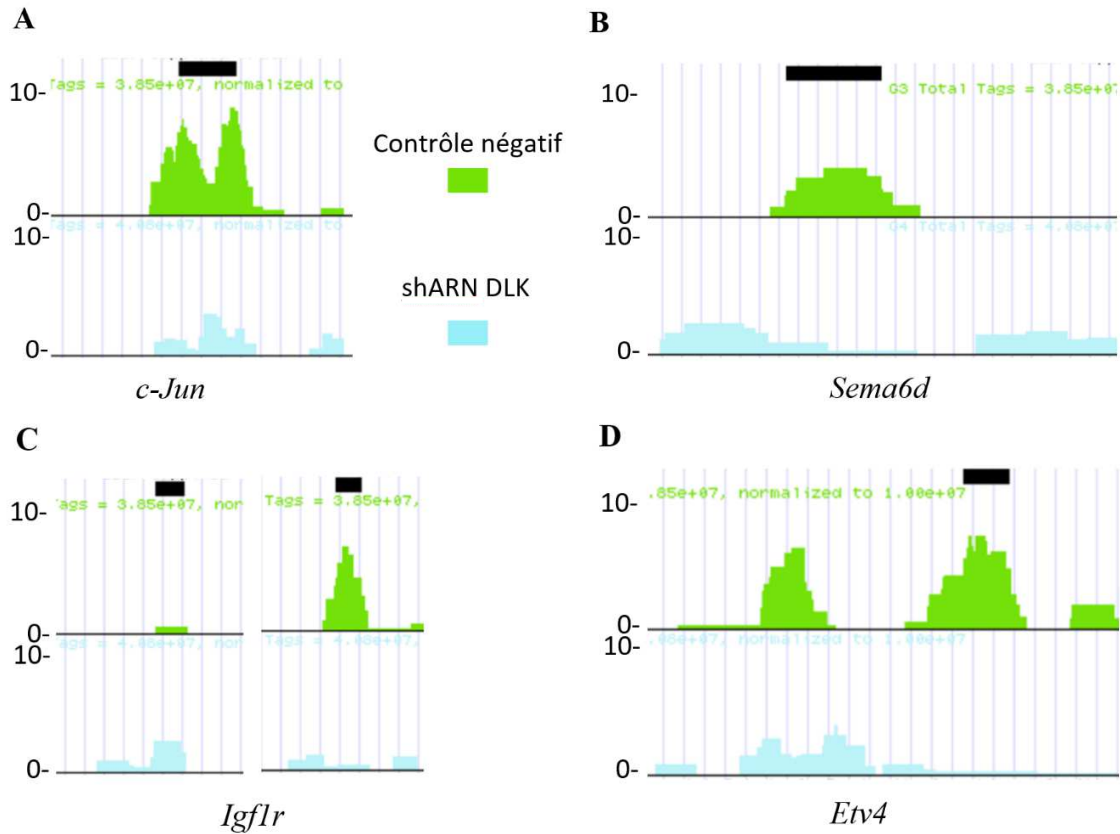


Figure 16. Régions d'enrichissement de c-Jun sur la chromatine dans les Neuro-2a déplétées en DLK par ARN interférence.

Régions d'enrichissement quantifiées par la méthode ChIP-seq. Des régions enrichies du facteur de transcription c-Jun sur la chromatine des cellules contrôle shARN pLKO (vert) en comparaison avec celles déplétées shARN DLK (bleu) des gènes (A) *c-Jun*; (B) *Sema6d*, sémaphorine 6d; (C) *Igflr*, *Insulin like growth factor 1 receptor*; (D) *Etv4*, *ETS Variant Transcription Factor 4*. Les cellules sont en condition de différenciation depuis 24h. L'échelle représente la quantité relative d'enrichissement de c-Jun sur la chromatine du gène respectif. Le carré noir indique une différence d'enrichissement significative entre le contrôle et le shARN DLK telle que déterminée par l'analyse bio-informatique réalisée.

Les fonctions de la régulation de la différenciation neuronale et la morphogenèse des projections neuronales ont été retenues, car le phénotype engendré sur les neurites était observable,

caractérisé et attendu dans le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO (figure 15 A et B). Ensuite, pour tous les gènes inclus dans les deux premiers groupes des fonctions biologiques, inscrits en rouge dans le tableau 4, chacune des régions de la chromatine démontrant une différence d'enrichissement de c-Jun identifiée a été visualisée, l'expression de ceux-ci dans les Neuro-2a a été vérifiée et la présence des motifs que c-Jun reconnaît sur la chromatine (point 1.6) a été confirmée (Mundade *et al.*, 2014; Blondeau *et al.*, 2016; Messegueur *et al.*, 2002; Farré *et al.*, 2003). Enfin, les gènes étudiés dans ce présent projet sont écrits en rouge au tableau 4.

Tableau 4. Fonctions biologiques des gènes identifiés par ChIP-seq selon le GO.

| Groupes des fonctions biologiques | Gènes associés |
|--|--|
| Morphogenèse des projections neuronales | <i>Abl2</i> , <i>Atg7</i> , <i>Bcl11b</i> , <i>Cacna1a</i> , <i>Cdh11</i> , <i>Cntnap2</i> , <i>Dab2ip</i> , <i>Ep300</i> , <i>Etv4</i> , <i>Evl</i> , <i>Gpm6a</i> , <i>Igf1r</i> , <i>Itga1</i> , <i>Jade2</i> , <i>Kdm1a</i> , <i>Kif20b</i> , <i>Lrp4</i> , <i>Ncam1</i> , <i>Nkx6-1</i> , <i>Nrg1</i> , <i>Ntrk3</i> , <i>Ppp1r9a</i> , <i>Ppp3ca</i> , <i>Ptn</i> , <i>Rab21</i> , <i>Sema6d</i> , <i>Stxbp5</i> , <i>Tbr1</i> , <i>Unc5d</i> , <i>Vegfa</i> |
| Régulation de la différenciation neuronale | <i>Abl2</i> , <i>Bcl11b</i> , <i>Bmp5</i> , <i>Brinp2</i> , <i>Cacna1a</i> , <i>Cas21</i> , <i>Creb3l2</i> , <i>Dab2ip</i> , <i>Disp3</i> , <i>Ep300</i> , <i>Grn</i> , <i>Igf1r</i> , <i>Jag1</i> , <i>Kdm1a</i> , <i>Lrp4</i> , <i>Myli1</i> , <i>Nkx6-1</i> , <i>Nrg1</i> , <i>Ntrk3</i> , <i>Plppr5</i> , <i>Ppp1r9a</i> , <i>Ppp3ca</i> , <i>Ptn</i> , <i>Rab21</i> , <i>Rapgef1</i> , <i>Sema6d</i> , <i>Sox11</i> , <i>Tbr1</i> , <i>Tenm3</i> , <i>Vegfa</i> , <i>Zhx2</i> , <i>Zmynd8</i> |
| Régulation du potentiel membranaire | <i>Chrna7</i> , <i>Adra1a</i> , <i>Adrb2</i> , <i>App</i> , <i>Cacna1a</i> , <i>Cd36</i> , <i>Fgf12</i> , <i>Gabra1</i> , <i>Gabra2</i> , <i>Got1</i> , <i>Gria1</i> , <i>Kcna2</i> , <i>Kcnk2</i> , <i>Ppp3ca</i> , <i>Slc8a1</i> , <i>Tacr1</i> , <i>Tmem135</i> , <i>Slc25a27</i> , <i>Ppa2</i> , <i>Ano1</i> , <i>Foxp1</i> , <i>Gla3</i> , <i>Kcnh7</i> , <i>Kcnk12</i> , <i>Cttna3</i> |
| Comportement | <i>Chrna7</i> , <i>Adrb2</i> , <i>Alb</i> , <i>App</i> , <i>Cacna1a</i> , <i>Cd36</i> , <i>Crh</i> , <i>Fgf12</i> , <i>Gria1</i> , <i>Hif1a</i> , <i>Ido1</i> , <i>Kcna2</i> , <i>Mup5</i> , <i>Myo6</i> , <i>Pbx3</i> , <i>Shc3</i> , <i>Tacr1</i> , <i>Slc7a11</i> , <i>Csnk1e</i> , <i>Fign</i> , <i>Cntnap2</i> , <i>Als2</i> , <i>Lrrtm1</i> , <i>Cln6</i> , <i>Foxp1</i> , <i>Cpeb3</i> , <i>Pak6</i> , <i>Unc79</i> , <i>Ythdf1</i> , <i>Lsamp</i> , <i>Vps13a</i> , <i>Gpr52</i> |
| Mémoire et apprentissage | <i>Chrna7</i> , <i>Adrb2</i> , <i>App</i> , <i>Crh</i> , <i>Gria1</i> , <i>Hif1a</i> , <i>Shc3</i> , <i>Tacr1</i> , <i>Slc7a11</i> , <i>Cntnap2</i> , <i>Cpeb3</i> , <i>Pak6</i> , <i>Ythdf1</i> |

En rouge sont les catégories ainsi que les gènes qui ont été sélectionnés pour les analyses subséquentes selon les critères énumérés dans le texte.

En réalisant le protocole complet de rt-qPCR (point 2.9) avec les cellules CRISPR/Cas9 DLK KO, en conditions différenciées ou non, les résultats ont permis d'évaluer le changement d'expression de certains gènes sélectionnés comparativement au contrôle (figure 12 H, I, J). Malheureusement, l'expression des gènes *Lrp4*, *Dab2ip* et *Cacna1a* n'a pu être testée par faute d'efficacité des amorces conçues (point 2.9). Cependant, tous les autres gènes ont pu faire partie de l'essai, car les amorces étaient spécifiques et avaient sensiblement le même taux d'efficacité

qui se situait aux alentours de 105% à 110% (point 2.9). À priori, deux contrôles internes réputés pour être stables, *Tbp* et *Rplp0*, avaient été incorporés aux analyses. Ces deux gènes rencontraient bien les attentes, mais en y ajoutant *Zmynd8* et *Atg7*, qui n'ont subi aucun changement au niveau de leur expression, la valeur de variation moyenne (équation 2.2) ainsi que celle de la valeur M (équation 2.3) étaient diminuées. Ces valeurs doivent se situer sous 0,25 et 0,5 respectivement, mais plus elles sont faibles, plus les résultats deviennent fiables (point 2.9). Donc, en incorporant ces gènes aux contrôles internes, les valeurs passent de 0,0938 à 0,0810 pour la première (équation 2.2) et de 0,2705 à 0,1883 pour la deuxième (équation 2.3) (résultats non montrés). Puisque ces deux valeurs confirment la qualité des résultats, *Zmynd8* et *Atg7* ont été ajoutés et l'essai totalise finalement 4 gènes contrôles. Enfin, puisque la valeur de variation moyenne (équation 2.2) ainsi que celle de la valeur M (équation 2.3) rencontrent bien les normes de qualité, le QR (*fold change*) de l'expression de chacun des gènes (équation 2.1) sélectionnés a pu être déterminé.

Similairement aux résultats de l'expression des gènes *Zmynd8* et *Atg7*, celle du gène *Etv4* montrée à la figure 17 A, n'est pas affectée. Comme pour les trois gènes précédemment nommés, l'impact de l'invalidation de DLK n'a eu aucun effet significatif sur l'expression des gènes *Abl2*, *Atg7*, *Ncam1* et *Rab21* (résultats non présentés).

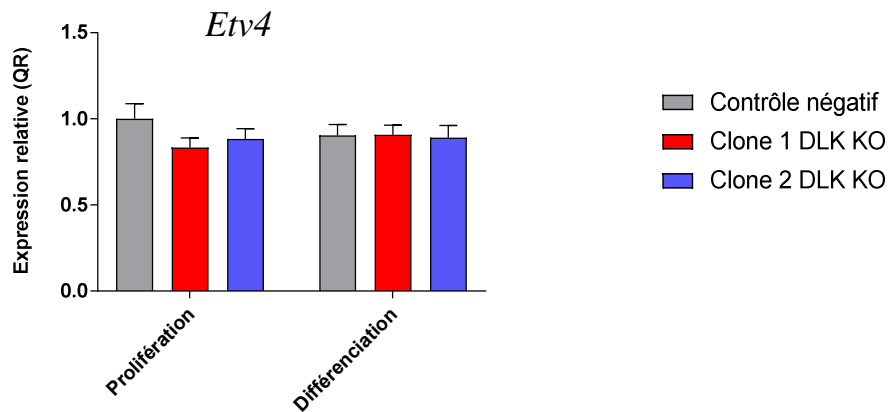
Contrairement aux gènes qui ne sont pas affectés par le KO de DLK dans les conditions testées, l'expression des gènes *Igf1r* et *Sema6d* est augmentée significativement dans les clones (figure 17 B et C). D'abord, en ce qui concerne *Igf1r*, les clones indiquent un niveau d'ARNm presque doublé comparativement au contrôle dans les deux conditions testées (figure 17 B). Le récepteur IGF1 (*IGF1r*) joue un rôle crucial dans la migration neuronale, dans l'orientation, dans le changement de polarité ainsi que dans l'initiation de la formation des axones (Guil *et al.*, 2017). Lorsque son rôle a été déterminé par l'équipe de Guil *et al.* (2017), la voie PI3K a été identifiée pour mener à terme la migration cellulaire dans le cortex cérébral. Déjà en 2006, les travaux d'Ozdindler et Macklis (2006) avaient montré que la voie PI3K et que celle de ERK étaient toutes deux impliquées dans la croissance axonale via IGF1r. Enfin, plus récemment, un article a relié DLK avec une composante importante de la voie IGF1, *Insulin-like growth factor-*

binding protein 5 (IGFBP5), comme les travaux de Blondeau *et al.*, (2016) l'avaient aussi montré avec un ARN interférant contre l'ARNm de DLK. Effectivement, en testant une molécule inhibitrice patentée de DLK, issue des travaux de Patel *et al.* (2017), dans un modèle murin, il a été démontré que cette inhibition entraîne l'augmentation de la protéine IGFBP5 dans le cervelet (Goodwani *et al.*, 2020). Cette protéine a comme caractéristique de limiter la biodisponibilité de IGF1, le ligand qui active IGF1r. Les auteurs ont montré que la phosphorylation du récepteur IGF1r était diminuée sous l'effet de l'inhibition de DLK, mais que sa présence était la même en présence ou en absence de DLK (Goodwani *et al.*, 2020). Les résultats du présent projet indiquent qu'au contraire, l'inactivation de DLK augmente de façon significative la transcription de l'ARNm du gène *Igf1r* dans les cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO comparativement au contrôle dans les deux conditions de culture (figure 17 B).

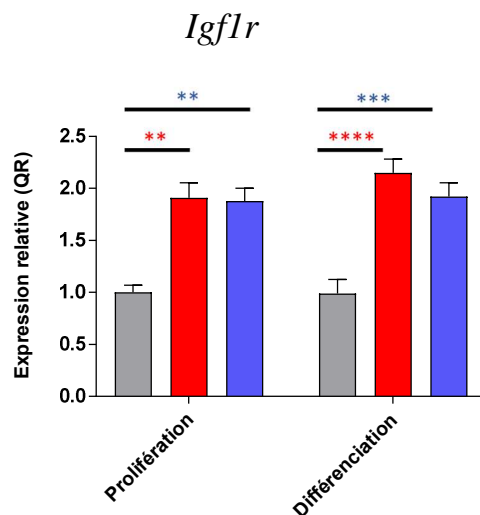
Cette différence entre les résultats pourrait être attribuable d'abord au fait que les modèles sont complètement différents (Housden et Perrimon, 2016; Peretz *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2019). Ensuite, bien que l'ARNm soit augmenté dans les clones, il faudrait valider ce résultat au niveau protéique. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'inactivation de DLK sur la phosphorylation du récepteur IGF1 et d'enfin comparer les résultats avec ceux de Goodwani *et al.* (2020).

Concernant *Sema6d*, le deuxième gène dont l'expression est affectée par l'absence de DLK dans les cellules clonales DLK KO, on peut constater à la figure 17 C, que l'expression relative de *Sema6d* est augmentée. Effectivement, la lignée clonale 1 affiche le double d'expression comparativement au contrôle, tant en conditions de prolifération que différenciées. Dans le cas du clone 2, la différence est significative dans les deux modes de culture, mais ce n'est qu'en condition différenciée que l'expression de *Sema6d* est doublée par rapport aux cellules contrôle (figure 17 C). Les sémaphorines (SEMAS) sont une famille de protéines classées en 8 groupes, selon qu'elles soient transmembranaires, cytoplasmiques ou sécrétées et selon la phylogénie qui s'y rattache (Goodman *et al.*, 1999). Il y a déjà plus de 20 ans que les SEMAS sont connues pour leurs rôles dans la neurogenèse, notamment en altérant le cytosquelette à partir du cône de croissance des axones ce qui engendre des signaux chimiotaxiques de répulsion ou d'attraction

A



B



C

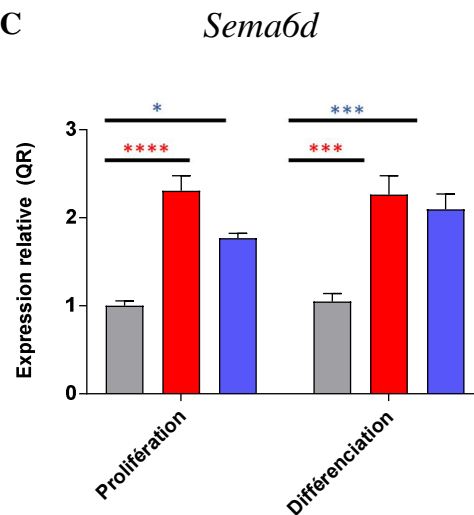


Figure 17. Variation de l'expression des gènes sélectionnés selon les lignées cellulaires.

(A) L'expression d'*Etv4* quantifiée par rt-qPCR n'est pas affectée par DLK KO. (B) et (C) La quantification de l'expression relative d'*Igf1r* et de *Sema6d* démontre une augmentation significative dans les modèles DLK KO comparativement au contrôle. DLK; *Dual leucine zipper kinase*, *Sema6d*; sémaphorine 6d, *Igf1r*; *Insulin like growth factor 1 receptor*, *Etv4*; *ETS Variant Transcription Factor 4*. Contrôle négatif en gris. Lignée clonale 1 en rouge. Lignée clonale 2 en bleu. N=4 et n=3 pour tous les gènes. N; essai biologique, n; réplica technique. L'expérience est contrôlée avec les gènes contrôles *Tbp*, *Rplp0*, *Zmynd8* et *Atg7*. Les astérisques représentent la valeur p. calculée avec *Sidak's multiple comparisons test* : *<0,05 **<0,005; ***<0,001 pour *Igf1r* et ***<0,0005 pour *Sema6d*; ****<0,0001.

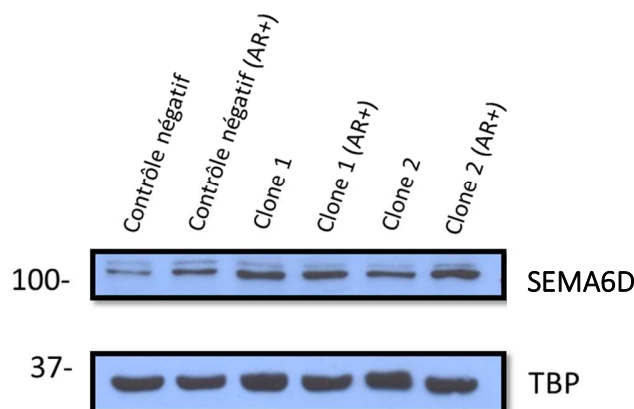
pour la guidance lors de l'élongation de ceux-ci (Goodman *et al.*, 1999, Koncina *et al.*, 2013; Alto et Terman, 2017). Décrite comme une protéine ayant des propriétés chimiorépulsives et qui possède la capacité de réguler négativement l'extension des axones selon la banque d'information Uniprot, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de SEMA6D correspond parfaitement à la description qu'on lui donne et mis ensemble, correspond aux phénotypes engendrés sur les neurites (figure 15 A et B, figure 17 C) des clones 1 et 2.

3.5 La protéine SEMA6D est augmentée en conditions de différenciation et dans les lignées clonales Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO

Afin de vérifier si les effets de l'inactivation de DLK sur l'expression du gène de *Sema6d* se manifeste de la même façon au niveau de la protéine, les échantillons protéiques des cellules Neuro-2a mutantes ou non ont fait l'objet d'un immunobuvardage avec un anticorps dirigé contre la protéine SEMA6D (figure 12 J). Comme l'illustre la figure 18, l'abondance de la protéine SEMA6D corrèle avec l'expression de son gène pour les clones comparativement au contrôle (figure 17 C). Donc, les résultats suggèrent que DLK régule négativement l'expression de cette protéine.

Les résultats concernant le contrôle négatif démontrent que malgré le fait que l'expression du gène *Sema6d* n'est pas affectée entre les conditions de prolifération et de différenciation, la quantité de la protéine SEMA6D l'est (figure 18 A et B). Pris ensemble, ces résultats suggèrent d'abord que c-Jun pourrait être un régulateur négatif de la transcription du gène *Sema6d* et qu'en plus, la voie DLK/JNK serait possiblement impliquée dans la régulation de la stabilité de SEMA6D par phosphorylation. Les résultats obtenus sont totalement compatibles avec le phénotype observé sur la formation des neurites. Effectivement, lorsque DLK est absente, il y a une augmentation de la protéine SEMA6D de 3 à 4 fois et ceci engendre une trop grande répulsion entre les neurites, qui affecte ainsi la qualité du réseau formé et parallèlement la longueur de ceux-ci (figure 15 A et B, figure 18 A et B). L'effet de la présence accrue de la SEMA6D dans le modèle Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO corrèle avec les travaux de Qu *et al.* (2002), qui avaient montré que la présence de la protéine SEMA6D affecte la croissance des

A



B

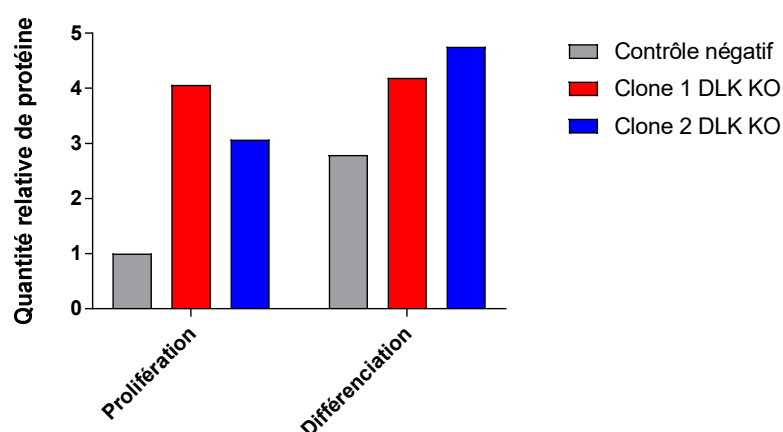


Figure 18. L'absence de DLK et la différenciation neuronale engendrent l'augmentation du niveau protéique de SEMA6D.

(A). Évaluation de la présence de la protéine SEMA6D par la technique d'immunobuvardage avec un anticorps spécifique contre celle-ci. (B) Le niveau relatif de SEMA6D a été mesuré avec le programme *Image Studio Lite* et normalisé par rapport à la protéine de contrôle de chargement *TATA binding protein* (TBP) et au contrôle négatif en conditions de prolifération. SEMA6D, sémaphorine 6d. AR+, conditions différenciées. Contrôle en gris. Lignée clonale 1 en rouge. Lignée clonale 2 en bleu.

axones et ce, de manière dose dépendante. L'augmentation de la protéine SEMA6D en conditions de différenciation lorsque DLK est présente permet probablement d'avoir un niveau de répulsion attendu pour diriger les neurites convenablement (Leslie *et al.*, 2011). Donc, bien que cette expérience nécessiterait l'ajout d'autres répliques biologiques pour confirmer le résultat au niveau protéique, les résultats préliminaires sont en accord avec les données de la littérature, lesquels impliquent SEMA6D dans le processus de différenciation des cellules neuronales (Qu *et al.*, 2002). De plus, l'hypothèse avait été émise par le laboratoire, selon laquelle, la voie de DLK/JNK serait en partie responsable de la régulation des protéines de la guidance des axones (Blondeau *et al.*, 2016).

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Le projet actuel visait à identifier des gènes impliqués dans l'axonogenèse dont la régulation est dépendante de la voie DLK/JNK. Pour y parvenir, deux lignées clonales Neuro-2a dont le gène *Dlk* a été inactivé par le système CRISPR/Cas9 ont été produites (figure 13 B). Ensuite, celles-ci ont été validées génétiquement ainsi que phénotypiquement (figure 14, 15 A et B). Enfin, ce nouveau modèle d'étude a permis d'identifier deux gènes, soient *Sema6d* et *Igf1r*, comme étant régulés par la voie DLK/JNK (figure 17 et 18).

4.1 Les cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO sont un excellent modèle d'étude

Il est bien connu que l'absence de DLK dans les neurones entraîne un retard de croissance des neurites et des axones (point 1.5.2) (Eto *et al.*, 2009; Hirai *et al.*, 2011; Tedeschi et Bradke, 2013; Blondeau *et al.*, 2016). Les clones produits dans ce projet démontrent bien ce phénotype attendu (figure 15 A et B). Donc, puisque les lignées cellulaires clonales créées présentent à la fois le retard de croissance attendue sur les neurites et que l'inactivation de *Dlk* est validée tant au niveau protéique que génétique (figure 13 B et 14), ceci permet d'affirmer qu'elles sont un excellent modèle d'étude pour ce projet ainsi que pour d'autres recherches ultérieures. De plus, les cibles non spécifiques (*off targets*) ont bien été évaluées (résultats non montrés) à l'aide de deux outils en ligne (point 2.1). Donc, les observations et les résultats obtenus dans ces travaux ne découlent pas de conséquences dues à une non-spécificité des ARN guides. Cependant, il serait intéressant de séquencer le génome entier des lignées clonales, du contrôle ainsi que celui des cellules Neuro-2a de type sauvage pour valider qu'aucune mutation non désirée n'est survenue. Effectivement, le système CRISPR/Cas9 est un outil simple et efficace pour créer des mutations génétiques néanmoins, il faut rester vigilant quant à la spécificité des guides, car ceux-ci représentent une contrainte de cette méthode (Wang *et al.*, 2020). Alors, le séquençage entier du génome deviendrait une nécessité, advenant le fait que les mêmes ARN guides soient utilisés ultérieurement dans un modèle murin.

À l'égard de la prolifération, les résultats de la mesure de la confluence cellulaire présentés à la figure 15 C n'indiquent aucune différence entre le contrôle et les clones. Les travaux de Ghosh *et al.* (2011) démontrent qu'en absence de DLK dans un modèle murin, les neurones du DRG survivent en plus grand nombre dû à la diminution de l'enzyme CAS 3, une conséquence de l'inactivation de DLK et par conséquent, de son activité apoptotique. Alors, dans ce modèle la prolifération des cellules neuronales n'est pas affectée par l'absence de DLK, mais on assiste plutôt à une diminution de l'apoptose (Ghosh *et al.* 2011). Les résultats de Itoh *et al.*, (2011) sont en accord avec les précédents. Effectivement, dans les neurones moteurs de la moelle épinière de souris, l'absence de DLK entraîne une diminution de la CAS 3 sous sa forme active comparativement aux embryons contrôles et ce, à partir de la 12^e journée du développement. Toujours en lien avec la prolifération cellulaire, des travaux du laboratoire ont montré dans un modèle de fibroblastes humains provenant des poumons (WI 38), que la déplétion de DLK par ARNi retarde la progression du cycle cellulaire et que la protéine régulatrice du cycle cellulaire, la cycline D1 était diminuée (Daviau *et al.*, 2011). De plus, dans un modèle de cellules bêta de l'îlot pancréatique murin isolées dix jours suivant la naissance, la déplétion de DLK entraîne aussi une diminution de l'expression de la cycline D1, en plus de la cycline D2, ce qui réduit la prolifération de ces cellules (Tenenbaum *et al.*, 2020). Enfin, la cycline D1 régule la neurogenèse pendant le développement de la moelle épinière et l'absence de la cycline D2 provoque l'arrêt de la prolifération neuronale adulte affectant la grosseur de l'hippocampe et du cervelet, entre autres. (Kowalczyk, *et al.*, 2004; Lukaszewics *et al.*, 2011).

Hypothétiquement, si l'inactivation de DLK entraînait à la fois un ralentissement du cycle cellulaire ainsi qu'une diminution ou un arrêt de l'apoptose dans les Neuro-2a DLK KO, il serait possible qu'aucune différence ne soit détectable entre les clones et le contrôle en mesurant la confluence cellulaire. Effectivement, car selon le taux de chacun, la population cellulaire totale pourrait rester stable malgré tout. Alors, bien que les résultats de la figure 15 C n'attestent d'aucune différence en % de confluence au fil du temps, d'autres expériences sont indispensables pour élucider pleinement les conséquences biochimiques sur les taux de prolifération et de survie cellulaire du KO de DLK. Donc, pour valider ou infirmer que DLK n'affecte pas la prolifération dans les Neuro-2a, des essais quantifiant l'activité de la CAS 3

avec le réactif Caspase-3/7, toujours à l'aide de l'appareil *Incucyte® S3* (<https://www.essenbioscience.com/en/applications/cell-health-viability/apoptosis/>) permettraient d'abord d'informer sur la protection apoptotique que confère l'absence de DLK dans les Neuro-2a (Ghosh *et al.* 2011; Itoh *et al.*, 2011). Ensuite, comme réalisé dans les travaux de Daviau *et al.* (2011) et de Tenenbaum *et al.* (2020), la quantification des cyclines D1 et D2 en présence et en absence de DLK pourrait donner un indice sur la progression du cycle cellulaire et parallèlement sur le taux prolifération. Si les résultats indiquaient une diminution de l'activité de la CAS 3 ainsi qu'une diminution des cyclines, une évaluation de l'incorporation de *thymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine*, généralement nommée BrdU, pourrait être conduite sur les lignées cellulaires conçues dans ce projet selon le protocole de la compagnie Abcam (<https://www.abcam.com/protocols/brdu-staining-protocol>), pour déterminer s'il y a une différence ou non au niveau de la prolifération en comparaison au contrôle.

Enfin, bien que les résultats de la mesure de la confluence cellulaire n'indiquent aucune différence entre les cellules DLK KO et leur contrôle, ils ne permettent cependant pas d'affirmer que cette kinase n'a aucun rôle à jouer dans la prolifération cellulaire des Neuro-2a. Il faut rester prudent, car dans la littérature plusieurs études ont démontré que DLK a une fonction importante à ce niveau (Daviau *et al.*, 2011, Tenenbaum *et al.*, 2020; Kowalczyk, *et al.*, 2004; Lukaszewics *et al.*, 2011). Finalement, malgré que le modèle reste à caractériser au niveau de la prolifération cellulaire, il est toutefois d'une excellente qualité pour définir les conséquences de l'inactivation de DLK sur l'expression de gènes régulant l'axonogenèse.

4.2 Facteurs contribuant à la stabilité de l'expression des gènes déterminés

De tous les gènes étudiés au cours de ce projet, l'expression de *Zmynd8*, de *Atg7*, et celle d'*Etv4* n'est pas affectée (point 3.4) (figure 17 A). De plus, l'absence de DLK n'a eu aucun effet sur l'expression des gènes *Abl2*, *Atg7*, *Ncam1* et *Rab21* (résultats non montrés). Bien que ce soient tous des gènes connus pour avoir une fonction dans la morphogenèse des projections neuronale ou dans la régulation de la différenciation (tableau 4), l'invariabilité de l'expression génique n'est pas nécessairement surprenante. Effectivement, *Etv4* a été caractérisé pour participer à

l'arborisation terminale des axones des neurones moteurs (Livet *et al.*, 2002). Cependant, dans ce présent essai, les conditions de différenciation ont été maintenues pour 24h afin d'être identiques à celles de l'expérience de ChIP-seq. Donc, puisque les cellules ne sont qu'au début du processus de la différenciation neuronale (figure 15 B), il n'est pas encore question de l'arborisation terminale de l'axone. De plus, il a été montré que l'induction de la différenciation à l'aide de l'acide rétinol prévient la conversion des Neuro-2a en neurones dopaminergiques (Tremblay *et al.* 2010). Toutefois, bien que les neurones dopaminergiques soient exclus en utilisant ce protocole, il est difficile de connaître le type exact de neurones dérivant des cellules Neuro-2a lorsqu'elles se différencient (Tremblay *et al.* 2010). Alors, même si les conditions de différenciation avaient été maintenues plus longtemps, mais que les neurones ne sont pas de type moteur, l'effet de l'absence de DLK ne serait peut-être pas le même que dans les travaux de Livet *et al.* (2002). Donc, étant donné que la différenciation neuronale débute, les résultats obtenus concordent avec les données de la littérature, mais il est impossible de conclure que DLK n'intervient pas dans la régulation du gène *Etv4* (Livet *et al.*, 2002).

Le maintien à un niveau équivalent d'expression pour les autres gènes entre les conditions et les modèles cellulaires ne signifie pas non plus que DLK n'a aucun rôle à jouer sur celle-ci. D'abord, comme pour *Etv4*, si les cellules avaient été maintenues dans les conditions provoquant la différenciation plus longtemps, il est tentant de présumer que les résultats auraient été différents. Aussi, étant donné que les résultats de la quantification de l'ARNm proviennent des cellules Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO et que les données préliminaires du protocole de ChIP-seq aient été obtenues à partir de cellules Neuro-2a shARN DLK KD, la différence pourrait être simplement dû au fait que la protéine DLK soit totalement absente (KO) ou bien diminuée (KD), respectivement. Effectivement, des travaux parus récemment ont démontré sur plus d'une trentaine de modèles cellulaires que les systèmes ARNi avaient des effets différents comparativement au système CRISPR/Cas9 (Lin *et al.*, 2019). Alors, il serait intéressant de quantifier l'ARNm de tous les gènes sélectionnés dans les shARN DLK KD ou bien de caractériser l'enrichissement du facteur de transcription c-Jun dans le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO, tous deux en comparaison avec leurs contrôles respectifs pour voir s'il existe une différence entre les deux systèmes. De plus, étant donné que les résultats ne tiennent que d'un

essai, répéter le protocole de ChIP-seq tel quel de deux à trois reprises supplémentaires pourrait possiblement changer les résultats. Enfin, il est parfois possible que l'enrichissement à la chromatine affecte un autre gène que celui qui est identifié. Ceci est possible grâce aux régions amplificatrices (*enhancers*) des régions promotrices qui peuvent activer des gènes plus lointains situés sur le même chromosome (Pennachio *et al.*, 2013). Alors, il est possible que les gènes sélectionnés qui n'ont démontré aucune différence de leur expression entre les conditions ne soient simplement pas régulés par le facteur de transcription c-Jun et/ou la voie DLK/JNK. Donc, ni la déplétion ni l'inactivation de DLK n'auront de conséquence si cette dernière hypothèse était vérifiée.

Bref, les hypothèses citées plus haut sont logiques bien qu'une autre possibilité soit que l'anticorps utilisé pour le ChIP-seq aurait pu ne pas être suffisamment spécifique contre la protéine c-Jun. Ceci aurait eu comme conséquence de donner des résultats qui incluent des enrichissements artéfactuels sur la chromatine. Cependant, comme mentionné au point 2.8, l'anticorps anti-c-Jun est bien spécifique en plus d'être validé pour le ChIP par le fabricant. Donc, la technique ChIP-seq ainsi que celle de rt-qPCR apportent toutes deux des résultats fiables qui doivent simplement être parfois investigués plus en détails pour être réconciliés.

4.3 c-Jun interviendrait comme régulateur négatif d'*Igflr* et de *Sema6d*

Étant donné que c-Jun est le facteur de transcription privilégié de la voie DLK/JNK dans les neurones (Hirai *et al.*, 2006, Huttlin *et al.*, 2010) et que les résultats du ChIP-seq de ce facteur (figure 16 B et C) ont montré une différence d'enrichissement à la chromatine des gènes *Igflr* et *Sema6d*, lorsque DLK est déplétée ou non, c-Jun serait potentiellement un régulateur négatif de ces deux gènes (figure 17 B et C). Cependant, comme mentionné plutôt, pour confirmer que c-Jun est bel et bien le facteur de transcription qui les régule directement via la voie DLK/JNK, il faudrait d'abord réaliser l'analyse de ChIP-seq dans le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO en comparaison à son contrôle. Si les résultats étaient les mêmes, il faudrait alors investiguer davantage en comparant l'expression de ces gènes en absence et présence de c-Jun, par exemple. Les résultats actuels permettent d'affirmer que l'absence de DLK entraîne une augmentation de

l'expression d'*Igf1r* et de *Sema6d*, donc que si c-Jun était le facteur de transcription de ces gènes, il serait un répresseur. Bien que c-Jun soit principalement connu comme étant un activateur, il est un régulateur négatif de la myélinisation dans les cellules de Schwann, entre autres (point 1.6) (Angel *et al.*, 1988; Eferl et Wagner, 2003; Parkinson *et al.*, 2008). Donc, il est tout à fait possible que c-Jun intervienne ainsi pour d'autres gènes. Contrairement aux résultats de Parkinson *et al.* (2008), où la répression de l'expression des gènes régulés par c-Jun a lieu qu'il soit phosphorylé ou non, les résultats suggèrent ici au contraire que la phosphorylation de c-Jun par DLK est nécessaire pour réprimer *Sema6d* et *Igf1r* (figures 15 B, 17 B et C). Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse en comparant les effets entre un modèle où c-Jun est phosphorylé en permanence et l'autre où c-Jun ne peut être phosphorylé. Pour ce faire, il faudrait d'abord muter tous les sites de phosphorylation potentiels de l'extrémité N-terminale soit avec des acides aspartiques pour mimer la phosphorylation de c-Jun ou bien avec des alanines pour empêcher la phosphorylation par JNK et enfin, de comparer les effets engendrés sur l'expression des gènes étudiés (Papavassilou *et al.*, 1995; Watson *et al.*, 1998). Aussi, en modifiant la séquence de liaison de c-Jun à la chromatine d'un ou de quelques nucléotides pour créer une mutation silencieuse qui empêche seulement c-Jun de reconnaître les motifs de ces deux gènes et en mesurant leur expression, il serait ainsi possible d'évaluer si c-Jun est le régulateur négatif d'*Igf1r* et de *Sema6d*. Si non, une autre alternative plus simple serait de fusionner les promoteurs de ces gènes à des séquences rapporteurs et d'évaluer l'impact de l'expression de c-Jun sur l'activité de ces promoteurs. Enfin, si tous les résultats des expériences proposées allaient dans le même sens que ceux obtenus dans ce projet, ceci permettrait de valider avec une plus grande certitude que c-Jun est le facteur de transcription qui régule ces gènes.

4.4 IGF1r serait possiblement une voie de secours

Dans la revue de littérature de Chitnis *et al.* (2008), il est possible de constater l'importance de la voie de signalisation d'IGF1r tant dans la physiologie normale que dans le cancer. Ce qu'il faut retenir d'abord de celle-ci est que ce récepteur peut activer la voie des MAPKs, dont JNK, pour engendrer ultérieurement la prolifération et l'initiation de la croissance axonale (Chitnis *et al.*, 2008; Guil *et al.*, 2017). Ensuite, le fait que JNK peut à son tour donner une rétroaction à la

protéine *Insulin receptor substrate* (IRS1) qui elle, participe à titre d'effecteur de la voie d'IGF1r, attire aussi l'attention (Chitnis *et al.*, 2008). Donc, l'augmentation de l'expression d'*Igf1r* engendré par l'absence de DLK (figure 17 B) pourrait d'une part être causée directement par la régulation de c-Jun et/ou d'autre part, par le fait que n'étant plus phosphorylé par DLK, JNK ne peut possiblement plus donner de rétroaction à la voie et ceci pourrait engendrer la surexpression d'*Igf1r* par un autre mécanisme. Puisque IGF1r est un récepteur qui permet l'initiation de la croissance axonale, il pourrait hypothétiquement être surexprimé pour contrer l'effet de l'augmentation de SEMA6D qui elle, à l'inverse, nuit à la croissance des neurites (Ozdinlerand and Macklis 2006; Guil *et al.*, 2017; Qu *et al.*, 2002). Enfin, la non-rétroaction sur la voie IGF1r par JNK au niveau de la protéine IRS1 pourrait faire en sorte d'inhiber en partie l'apoptose (Chitnis *et al.*, 2008). Effectivement, lorsque la voie IGF1r est active, elle a la capacité d'inhiber l'apoptose via IRS1, PI3K et ultimement, AKT (Chitnis *et al.*, 2008, Tu *et al.*, 2010). Alors, comme suggérée au point 4.1, la clarification de l'effet anti-apoptotique de l'absence de DLK dans les Neuro-2a s'avère importante, car en plus de la voie DLK/JNK qui a un effet régulateur sur l'apoptose, cette protection pourrait possiblement provenir indirectement et en partie de la voie IGF1r (point 1.4, figure 5) (Tu *et al.*, 2010). Bien que l'expression du gène *Igf1r* soit augmentée, il serait indispensable de valider ce résultat du côté protéique pour voir si l'accroissement est similaire. Si la surexpression du gène se traduit par l'augmentation protéique du récepteur, la vérification de son activité et de sa biodisponibilité s'imposerait. Effectivement, bien que IGF1r soit présent en plus grande quantité, il pourrait d'une part être inhibé par IGFBP5, une protéine qui s'y lie et qui diminue sa biodisponibilité pour ses ligands activateurs IGFI et IGFII (Chitnis *et al.*, 2008). Comme l'inhibition de DLK a entraîné l'augmentation d'IGFBP5 dans le modèle Neuro-2a shARN DLK (Blondeau *et al.*, 2016) et dans le cervelet de souris en présence d'un inhibiteur de DLK (Goodwani *et al.*, 2020), il faudrait donc valider si cette réponse est la même dans les Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO. D'autre part, il faudrait aussi vérifier si la protéine IRS1, par exemple, est augmentée, car bien que le récepteur soit présent à la membrane des cellules, les composantes permettant la transduction du signal doivent aussi l'accompagner pour que la voie soit fonctionnelle. Alors, pour que l'hypothèse de la voie de secours soit possible, le récepteur doit non seulement être présent avec les autres composantes de sa voie, mais il doit aussi être biodisponible à ses ligands.

Les résultats face à l'expression du récepteur IGF1r en absence de DLK sont très importants et nécessitent d'être examinés plus profondément (figure 17 B). Effectivement, car d'une part ce récepteur est impliqué dans des types de cancers qui ont un pronostique peu rassurant et d'autre part, parce qu'il a été montré néfaste dans les maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer et le Parkinson (Parker *et al.*, 2002; Spentzos *et al.*, 2007; George *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). Considérant que des molécules pharmacologiques inhibitrices de DLK sont ou seront en essais cliniques, l'inhibition de DLK pourrait engendrer des conséquences néfastes à long terme si l'expression d'*Igf1r* est augmentée et se traduit par l'accumulation de la protéine (Oetjen et Lemcke, 2016).

4.5 Le rôle de la voie DLK/JNK dans la régulation de *Sema6d*

La protéine SEMA6D est la plus récente de sa classe à avoir été identifiée (Goodman *et al.*, 1999). En revanche, les SEMAS sont très bien connues pour jouer un rôle important dans le développement du SN (point 3.4) (Goodman *et al.*, 1999, Koncina *et al.*, 2013; Alto et Terman, 2017). Les SEMAS peuvent se lier aux plexines, qui sont les récepteurs membranaires majoritaires de celles-ci (Jongbloets and Pasterkamp, 2014). C'est le cas de la SEMA6D qui sert de ligand à la plexine 1A (Jongbloets and Pasterkamp, 2014). Une propriété importante des SEMAS est qu'elles ont la capacité d'inverser un signal, c'est-à-dire de jouer le rôle d'un ligand ou bien d'un récepteur (Toyofuku *et al.*, 2004). Donc, dans le cas de SEMA6D, elle peut également jouer le rôle de récepteur et être activée par sa forme libre, par la plexine A1 et par d'autres molécules (Kumanogoh and Kikutani, 2010). Donc depuis sa découverte, les études ont permis de la caractériser dans certains contextes, mais beaucoup reste encore à élucider sur cette protéine (Kumanogoh and Kikutani, 2010; Koncina *et al.*, 2013; Jongbloets and Pasterkamp, 2014).

Aux figures 17 C et 18, les résultats montrés sont très clairs, l'absence de DLK favorise l'expression du gène *Sema6d* qui se traduit par une augmentation au niveau protéique. Ce résultat est le premier à identifier la voie DLK/JNK comme régulatrice potentielle de SEMA6D, bien que les travaux de Blondeau *et al.* (2016) avaient associés la déplétion de la kinase DLK

avec la diminution de l'expression du gène *Sema6b* dans un modèle Neuro-2a shARN DLK KD (Blondeau *et al.*, 2016). Les fonctions de la protéine SEMA6B sont similaires à celles de la SEMA6D, ce qui suggère que la diminution de l'expression de ce gène dans les Neuro-2a shARN DLK KD affecte la croissance des neurites parce que le niveau requis est trop faible. Effectivement, les travaux de Andermatt *et al.* (2014) ont démontré dans des poulets déplétés de SEMA6B que la croissance des axones des neurones de la commissure du tube neural est affectée. Puisque que le transcriptome complet des Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO n'a pas été caractérisé, il se pourrait que la répression du gène *Sema6b* soit aussi observée dans ces cellules. Enfin, bien que les résultats soient différents, ils sont tous les deux en accord avec la littérature qui décrit SEMA6B et SEMA6D comme des protéines impliquées dans la guidance de neurites (Matsuoka *et al.*, 2013; Alto et Terman, 2017). Les travaux de Larhammar *et al.* (2017) ont aussi recensé un effet possible de l'inhibition de DLK sur une protéine SEMA. Les auteurs ne discutent pas de ce résultat, mais l'expression du gène *Sema6A* est diminuée lorsque DLK est inhibée en condition de privation du facteur de croissance des nerfs (NGF) en comparaison au contrôle (Larhammar *et al.*, 2017). De toute la littérature actuelle, ces trois résultats sont les seuls qui relèvent d'expériences concrètes et qui démontrent que DLK pourrait être impliqué dans la régulation des SEMAs. Dans les banques de données de NCBI et d'Uniprot, la régulation de l'axonogenèse par les SEMAs 6A, 6B et 6D, est principalement basée sur des analyses bio-informatiques de la phylogénie et de l'ontologie des gènes (Gaudet *et al.*, 2011). De plus, les sémaphorines 6A, 6B, et 6D sont impliquées dans la migration des cellules de la crête neurale cardiaque ce qui est particulièrement intéressant, puisque DLK a été démontré pour y jouer un rôle important dans les cellules neuronales (Toyofuku *et al.*, 2004 et 2008; Tedeschi et Bradke, 2013). Alors, en mesurant les effets de l'inactivation de DLK sur la migration des Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO par la technique de blessure/cicatrisation avec l'appareil Incucyte® S3 (https://www.essenbioscience.com/media/upload/files/8000-0597A00_IncuCyte_Scratch_Wound_Assay.pdf) par exemple, il serait ensuite possible de les comparer avec des cellules ayant une inactivation ou une surexpression de SEMA6D pour vérifier dans quelles conditions les effets sont similaires. Aussi, avec la caractérisation du phénotype engendré sur la croissance des neurites dans les cellules qui surexpriment la protéine SEMA6D,

ceci permettrait d'associer concrètement, en totalité ou en partie, les effets de cette protéine au phénotype observé ici (figure 15 A et B).

À la figure 18, les cellules contrôles démontrent une augmentation de SEMA6D lorsque celles-ci sont en conditions de différenciation en comparaison aux conditions de prolifération. Puisque l'expression du gène *Sema6d* ne change pas entre ces conditions, mais que le niveau protéique augmente, les résultats suggèrent donc que la voie de signalisation JNK pourrait être impliquée dans la stabilisation de la protéine. Cette hypothèse est discutée au point 4.6 en expliquant le modèle proposé. Enfin, comme pour *Igflr*, la poursuite des travaux touchant SEMA6D est primordiale. Effectivement, puisque SEMA6D est une protéine qui a une propriété de répulsion, les effets sur les neurones lorsque des inhibiteurs de DLK seraient administrés à des patients atteints de maladies neurodégénératives, pourraient engendrer des effets indésirables à long terme. Si tous les axones des neurones acquièrent lentement des SEMA6D en quantité trop élevée dans leurs membranes, les effets de répulsion entre les axones pourraient engendrer des effets plus néfastes que si les inhibiteurs n'étaient pas administrés, même si à court terme, l'inhibition de DLK donne des résultats positifs.

4.6 Modèle proposé de la voie DLK/JNK

La différenciation neuronale apporte à elle seule une augmentation de la protéine SEMA6D (figure 17 C et 18). Effectivement, le niveau d'ARNm reste stable pour le contrôle entre les conditions de prolifération et celles de différenciation, mais la quantité de la protéine augmente en différenciation. Puisque la voie DLK/JNK régule négativement l'expression du gène *Sema6d* possiblement via p-c-Jun, mais que l'abondance de celle-ci s'accroît dans le contrôle en différenciation (figure 13 B), ces résultats suggèrent donc que la voie serait impliquée à la fois dans la régulation du gène *Sema6d* ainsi que dans une modification post-traductionnelle de la protéine. La phosphorylation de SEMA6D par les MAPKs est possible, car trois sites potentiels de phosphorylation, soit les sérines 723, 734 et 931, sont suivies d'une proline, ce qui est une caractéristique de cette famille de kinases (Huttlin *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2002). Cette phosphorylation pourrait être effectuée par JNK, composante majeure de la voie, et ainsi

permettre la stabilisation de la protéine SEMA6D. En analysant l'ensemble des résultats (figures 13 B, 17 C et 18), il est évident que la phosphorylation ne serait pas transmise par DLK, mais possiblement par une autre protéine utilisant une partie de cette voie. Plusieurs hypothèses sur cette autre protéine pourraient être émises, mais une faisant partie de la voie des MAPKs serait logique à émettre.

Alors, en plus d'être une MAPKKK qui active JNK, LZK est similaire à DLK et elle est souvent associée aux mêmes processus biologiques (point 1.3) (Jin et Zheng, 2019). Bien qu'elle soit moins étudiée, il est connu que LZK est impliquée dans la croissance des neurites (Chen *et al.*, 2016). Non seulement elle joue un rôle dans ce processus, mais la voie de LZK converge vers Map2K7/JNK et celle-ci est activée dans les Neuro-2a en différenciation ainsi que dans les neurones du cervelet en maturation (Cheng *et al.*, 2016).

Donc, à la figure 19, un modèle de signalisation est proposé en lien avec les résultats de ce projet (chapitre 3) ainsi qu'avec certaines évidences provenant de la littérature (Goodman *et al.*, 1999, Huttlin *et al.*, 2010; Koncina *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2016; Alto et Terman, 2017). D'abord, dans les cellules en prolifération, la voie DLK/JNK/c-Jun permettrait de réguler négativement l'expression de *Sema6d* et *d'Igf1r* (figure 19 A). Avec la collaboration de LZK, une autre cascade de phosphorylation a lieu, mais celle-ci permettrait à JNK de phosphoryler SEMA6D (figure 19 A) (Cheng *et al.*, 2016). Puisque le niveau d'expression du gène est faible, la quantité de SEMA6D stabilisée par LZK le sera aussi. En conditions de différenciation, la combinaison de la régulation par DLK et LZK, qui peuvent être activées à partir d'un signal différent ou elles-mêmes être exprimées de façon temporelle (Cheng *et al.*, 2016), permettrait de réguler SEMA6D à un niveau adéquat qui assurerait le maintien de la structure du cône de croissance et la guidance des neurites, des dendrites ainsi que des axones (Qu *et al.*, 2002) (figure 19 A). Pour IGF1r, la présence de DLK causerait une régulation négative de l'expression du gène ainsi que la possibilité de rétroaction par JNK sur IRS1. Dans le cas où DLK est absente, d'abord la régulation négative des gènes *Sema6d* et *Igf1r* par c-Jun n'est plus possible (figure 19 B).

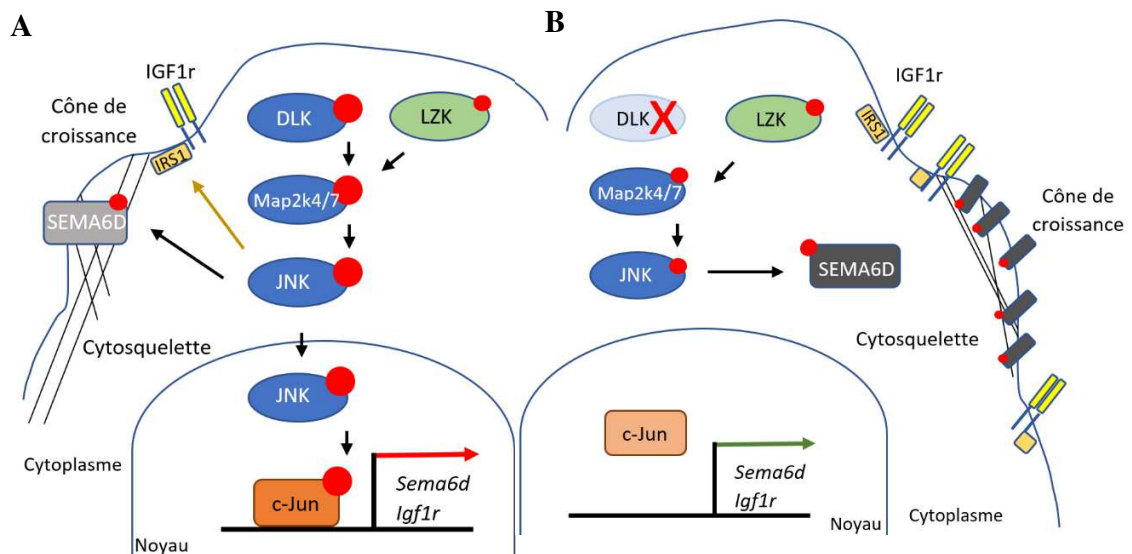


Figure 19. Modèle proposé de la voie DLK-LZK/JNK.

(A) Cellule Neuro-2a. La cascade de phosphorylation débute à partir d'un signal reçu qui active DLK et LZK. L'activation de DLK entraîne ultérieurement la phosphorylation de c-Jun, qui régule négativement les gènes *Sema6d* et *Igf1r*. Cette voie permet aussi à JNK de transmettre un signal de rétroaction à la protéine IRS1, un effecteur d'IGF1r. L'activation de LZK permet subséquemment la phosphorylation de SEMA6D et possiblement de c-Jun par JNK, ce qui stabilise cette première et permet à c-Jun de réguler des gènes (non illustré). (B) Cellule Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO. L'inactivation de DLK entraîne la perte de la voie qui permet la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun et qui par conséquent ne régule plus *Sema6d* et *Igf1r*. La stabilisation de la protéine SEMA6D est toujours possible par la composante LZK. Il y a alors une accumulation de SEMA6D aux cônes de croissance, ce qui perturbe le développement et la croissance des neurites. L'absence de DLK ne permet plus à JNK de transmettre le signal de rétroaction à IRS1. Les cercles rouges représentent la cascade de phosphorylation entre les protéines reliées par une flèche noire. La grosseur du cercle indique de quelle kinase provient le signal. La flèche orange indique un signal de rétroaction. Les flèches verte et rouge indiquent si les gènes sont activés ou régulés négativement, respectivement. DLK, *Dual leucine zipper kinase*; MAPK2 4/7, *Mitogen-activated protein kinase kinase 4 ou 7*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; *Sema6d* ou SEMA6D, *Sémaphorine 6d*; *Igf1r* ou IGF1r, *Insulin like growth factor 1 receptor*; LZK, *Leucine zipper-bearing kinase*.⁷

Ensuite, la protéine SEMA6D est augmentée d'une part grâce à la hausse de l'expression du gène et d'autre part, au moyen de la stabilisation de celle-ci possiblement via la voie LZK/Map2k7/JNK (figure 19 B). Enfin, il faudrait déterminer par immunobuvardage si IGF1r est augmenté, mais pour la proposition de la figure 19, il a été considéré que l'augmentation de l'expression du gène se traduisait par une élévation du niveau protéique. De plus, comme discuté au point 4.4, la présence de IRS1 ainsi que celle de IGFBP5 doivent être évaluées, afin de s'assurer que la voie a la capacité d'être fonctionnelle et que le récepteur soit biodisponible pour ses ligands.

Le modèle proposé doit être investigué plus profondément pour d'abord déterminer si c-Jun est le facteur de transcription régulant *Sema6d* et *Igf1r* dans les Neuro-2a. Ensuite, puisqu'il existe différentes combinaisons de dimères dans la cellule, soit DLK-DLK, DLK-LZK et LZK-LZK (Cheng *et al.*, 2016), et que d'autres sont possibles entre c-Jun lui-même et les composantes du complexe AP-1 (Eferl et Wagner, 2003), il pourrait y avoir un autre type de régulation que celle qui est présentée à la figure 19. Pour tenter de valider la voie suggérée, un modèle Neuro-2a CRISPR/Cas9 LZK KO pourrait être établi. Ensuite, la caractérisation du niveau de phosphorylation de SEMA6D par immunobuvardage entre le modèle LZK KO et son contrôle permettrait d'établir si cette kinase participe à la cascade de phosphorylation de SEMA6D. Enfin, déterminer quelles sont les protéines dont la phosphorylation est JNK1, JNK2 et JNK3 dépendante donnerait un indice quant à la phosphorylation de SEMA6D par ces kinases. Pour y parvenir, un protocole d'analyse du phosphoprotéome pourrait être choisi parmi plusieurs. L'article de revue de Xue et Tao (2013) décrit bien les techniques permettant d'y arriver ainsi que les avantages et les inconvénients de chacun.

4.7 Deux modèles d'études qui peuvent apporter des résultats différents, mais valides

Tel que mentionné auparavant dans ce mémoire, des différences peuvent exister entre certains résultats des modèles shARN et CRISPR/Cas9 (Housden et Perrimon, 2016; Peretz *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2019). Une analyse du phosphoprotéome du modèle Neuro-2a shARN DLK KD a été réalisée au laboratoire de Richard Blouin (St-Cyr, 2020). Dans ces travaux, un changement

significatif de la phosphorylation de la protéine SEMA6D entre le contrôle et le shARN DLK KD n'a pas été observé. Cependant, ce résultat n'est pas nécessairement incompatible avec l'hypothèse proposée plus haut (figure 19). Une explication potentielle réconciliant les modèles shARN DLK KD et CRISPR/Cas9 DLK KO est proposée (figure 20). En effet, il est possible que la différence entre ces approches provienne de niveaux d'expression et de phosphorylation de c-Jun qui seraient affectés différemment par la déplétion de DLK ou par l'inactivation du gène *Dlk*. Puisque dans le modèle shARN DLK KD, la protéine DLK reste tout de même légèrement exprimée, mais qu'elle est totalement absente dans le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO, cette différence pourrait suffire à affecter c-Jun, qui à son tour aurait un impact sur la quantification du phosphoprotéome (figure 20). Si une phosphorylation stabilisante de SEMA6D existe de manière indépendante de DLK, ce qui pourrait être le cas étant donné les résultats présentés à la figure 18, la phosphorylation de SEMA6D pourrait être plus facilement détectable lorsque cette protéine est plus abondante. Le shARN DLK KD, en diminuant l'abondance de DLK, réduirait l'effet antagoniste de c-Jun sur SEMA6D, amenant ainsi une hausse de l'expression et de la phosphorylation de cette dernière. Le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO, où DLK n'a plus aucun effet étant donné son inactivation apporterait une expression et une phosphorylation encore plus grande de SEMA6D. Ainsi, lors de l'analyse des résultats du phosphoprotéome, la différence entre le contrôle négatif et le shARN DLK KD pourrait ne pas être significative, tandis qu'elle pourrait le devenir dans le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO, (figure 20).

Bien que des auteurs aient démontré qu'une différence entre les systèmes shARN et CRISPR/Cas9 puisse être causée, entre autres, par une non-spécificité de la cible, par une toxicité des systèmes ou par une compensation intrinsèque (Peretz *et al.*, 2018; Housden et Perrimon, 2016; Lin *et al.*, 2019), il demeure possible que la différence soit plutôt causée par le niveau d'inhibition de la protéine ciblée selon le système utilisé (figure 20). Une analyse du phosphoprotéome du modèle CRISPR/Cas9 DLK KO en comparaison avec celui du modèle shARN DLK KD pourrait apporter une réponse adéquate à cette dernière hypothèse.

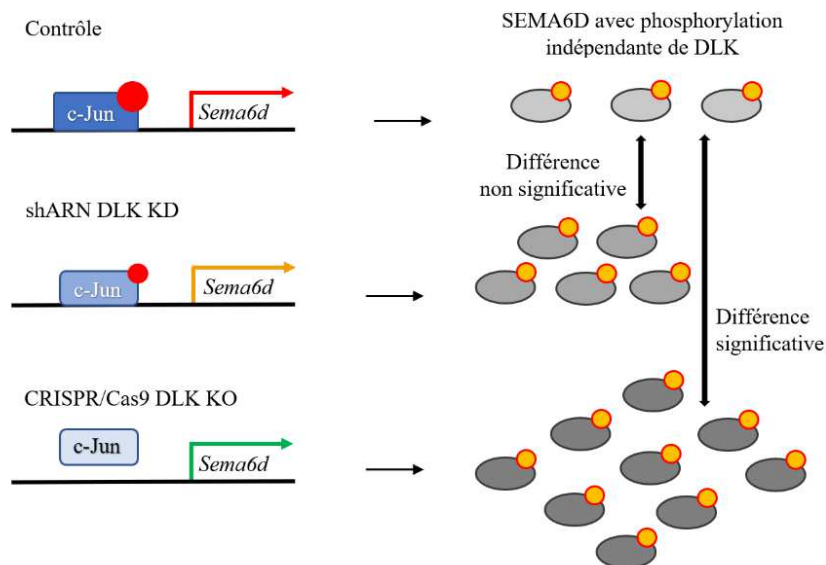


Figure 20. Schématisation des effets potentiels de c-Jun sur l'expression de SEMA6D entre les modèles shARN DLK KD et CRISPR/Cas9 DLK KO

La protéine DLK pourrait jouer un rôle important dans la phosphorylation de c-Jun permettant la répression de *Sema6d*. Dans le cas du contrôle Neuro-2a, les niveaux d'expression et de phosphorylation de c-Jun sont normaux et donc plus élevés que dans les modèles shARN et CRISPR/Cas9 ciblant DLK. Ainsi, l'expression de *Sema6d* est plus fortement réprimée par c-Jun. Dans ce contexte, l'abondance et la phosphorylation de SEMA6D seraient faibles. Pour les modèles Neuro-2a shARN DLK KD et CRISPR/Cas9 DLK KO, la diminution ou l'absence de DLK entraînerait une réduction de la répression de SEMA6D par c-Jun et par conséquent, causer une augmentation de l'expression de SEMA6D et potentiellement de sa forme phosphorylée. La différence entre les niveaux de phosphorylation de SEMA6D chez le contrôle, le shARN DLK KD ou le CRISPR/Cas9 DLK KO pourrait être significative seulement chez le modèle CRISPR/Cas9 DLK KO, puisque la quantité protéique de SEMA6D augmente elle aussi. DLK, *Dual leucine zipper kinase*; *Sema6d* ou SEMA6D, Sémaphorine 6d; Les flèches rouge, jaune et verte représentent le niveau d'expression de *Sema6d*, c'est-à-dire de plus réprimé à aucunement réprimé. Les ovales gris représentent SEMA6D. Les cercles rouges et jaunes représentent la phosphorylation des protéines. Les flèches noires représentent la comparaison du niveau de phosphorylation de SEMA6D via une analyse du phosphoprotéome.

4.8 Les perspectives de ce projet

Dans ce projet, il a été montré que la voie DLK/JNK régule négativement *Sema6d* et *Igf1r* dans les cellules Neuro-2a. Au fil du présent mémoire, plusieurs expériences ont été proposées afin d'éclaircir les résultats présentés. Parmi celles-ci, d'abord la répétition du protocole d'immunobuvardage sur les protéines SEMA6D et IGF1r s'impose (point 3.4 et 3.5). Ensuite, la poursuite de l'investigation de l'effet de l'absence de DLK dans la prolifération (point 4.1), la réalisation d'une analyse ChIP-seq de c-Jun dans les Neuro-2a CRISPR/Cas9 DLK KO et le contrôle (point 4.2 et 4.3), la caractérisation plus approfondie des composantes touchant la voie IGF1r, l'établissement d'un modèle Neuro-2a CRISPR/Cas9 LZK KO incluant la vérification du niveau de phosphorylation de SEMA6D dans ce modèle et l'établissement du phosphoprotéome de JNK1, JNK2 et JNK3 (point 4.6) ainsi que celui du modèle CRISPR/Cas9 DLK KO (point 4.8) donneraient un lot d'informations pertinentes pour tenter de comprendre certaines hypothèses émises à la suite des résultats obtenus. Ces expériences seraient donc les premières à entreprendre à court et à moyen terme.

Les résultats de ce projet sont d'une importance capitale, car si les effets de l'inactivation de DLK survenaient dans les patients atteints de maladies neurodégénératives qui testent les inhibiteurs de DLK en phase clinique, les dommages à long terme pourraient être plus grands que les bénéfices engendrés dès le départ. Puisque les études cliniques ne sont généralement pas conduites sur une très longue période, il serait même possible que les effets de l'augmentation de l'expression de *Sema6d* et *d'Igf1r* ne soient détectables qu'au-delà des études cliniques. Effectivement, il serait possible que les effets engendrés par l'absence de DLK (KO) soient plus drastiques et rapides que ceux où DLK n'est que déplétée (KD) ou inhibée. Alors, les effets secondaires engendrés par l'inhibition pharmacologique de DLK pourraient survenir plus lentement. Donc, l'augmentation de SEMA6D et d'IGF1r pourrait passer inaperçue lors des études cliniques et les effets néfastes leur étant attribuables seraient susceptibles de se manifester plus tardivement après le début du traitement.

Pour contrer les effets secondaires potentiels, il serait alors pertinent de coupler des inhibiteurs dans des modèles de maladies neurodégénératives murines pour vérifier si les effets sont synergiquement bénéfiques (Le Pichon *et al.*, 2017). Les couples d'inhibiteurs de DLK et de SEMAD6D ou de DLK et d'IGF1r pourraient donner un indice sur l'avantage que confèrent ceux-ci comparativement à l'inhibition de DLK seulement (Le Pichon *et al.*, 2017; George *et al.*, 2017). Enfin, une trithérapie comportant des inhibiteurs de DLK, de SEMA6D et d'IGF1r mériterait d'être testée pour vérifier si elle améliore les résultats. En plus des inhibiteurs, des ARNi ou des modèles murins CRISPR/Cas9 inductibles par exemple, ciblant les protéines d'intérêts seuls ou en combinaison fourniraient des informations cruciales sur la différence entre les modèles et en parallèle, sur les bienfaits d'une thérapie multiple. Cependant, la difficulté réside toujours dans la délivrance des molécules dans le SNC, mais en utilisant le glycopeptide-29 du virus de la rage, il serait possible de mieux cibler ce système (Chung *et al.*, 2020).

Dans un autre ordre d'idée, les résultats présentés dans le tableau 4 montrent des gènes qui sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire ainsi que dans le comportement. Dans ce projet, les gènes où il était possible d'observer un phénotype dans des cellules nerveuses ont été choisis. Cependant, considérant le fait que la voie DLK/JNK régule possiblement des gènes reliés au comportement et que les travaux de Mohammad *et al.* (2018) ont montré que JNK1 avait un rôle important à jouer dans l'anxiété chez les souris, le rôle de DLK dans l'anxiété devrait être investigué. Évidemment, car même si JNK1 est une cible thérapeutique potentielle contre l'anxiété, comme le mentionnent les auteurs, cette protéine transmet plusieurs signaux et son inhibition apporterait des conséquences adverses graves (Mohammad *et al.*, 2018).

Alors, pour tenter d'éviter ce problème, puisqu'ils seraient administrés sur une courte période de temps, des inhibiteurs, des ARNi ou inactivateurs, comme CRISPR/Cas9 ciblant DLK devraient être testés dans un modèle murin comme l'a fait l'équipe de Mohammad *et al.* (2018) afin de vérifier la contribution de DLK dans l'anxiété et lequel des outils donne le meilleur résultat. Finalement, puisqu'il a été démontré que l'anxiété pouvait mener à des maladies neurodégénératives, comme l'Alzheimer (Donavan *et al.*, 2018), il serait pertinent de conduire une expérience où DLK, SEMA6D et IGF1r sont soit inactivés, déplétés ou inhibés seuls, en

duo ou en trio dans des modèles murins avant de provoquer expérimentalement les maladies neurodégénératives par des composés pharmacologiques, par des mutations génétiques ou par des virus (Van Dam et De Deyn, 2011; Blesa et Przedborski, 2014; De Chiara *et al.*, 2019) pour voir si l'altération de DLK, seule ou en combinaison, prévient l'établissement des maladies de Parkinson ou de l'Alzheimer, par exemple.

4.9 Conclusion

Ce projet de maîtrise a permis la production de trois populations de cellules Neuro-2a dont le gène *Dlk* est inactivé à des niveaux différents par le système CRISPR/Cas9 selon l'ARN guide utilisé et deux lignées clonales où cette kinase est totalement absente. Les lignées clonales qui découlent de l'ARN guide 2 ont démontré un phénotype similaire et attendu se mesurant entre autres par une déficience de la croissance des neurites. Grâce à la conception de ce nouveau modèle, l'augmentation significative de l'expression des gènes *Igf1r* et *Sema6d* a été démontré en absence de DLK. Ces découvertes apportent des nouvelles connaissances sur le mécanisme d'action de la voie DLK/JNK qui jusqu'à ce jour étaient inconnues. Bien que certains résultats devront être confirmés à nouveau par des analyses d'immunobuvardage de type western par exemple, les résultats de l'expression des gènes sont concluants. Alors, un modèle de la voie DLK-LZK/JNK a été proposé en fonction des résultats et de la littérature actuelle. Enfin, puisque des molécules inhibitrices de DLK sont en essai clinique, il serait important d'évaluer si l'inhibition simultanée de SEMA6D, IGF1r et DLK améliore les résultats, considérant que l'augmentation de SEMA6D et d'IGF1r pourrait affecter négativement les bienfaits prometteurs de l'inhibition de DLK pour traiter les maladies neurodégénératives.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmad, I. (2001). Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42, 2743- 2748.

Altman, J. (1962). Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp. Neurol.* 5, 302-318.

Alto, L.T. and Terman, J.R. (2017). Semaphorins and their signaling mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 1493, 1-25.

Amura, C.R., Marek, L., Winn, R.A. and Heasley, L.E. (2005). Inhibited neurogenesis in JNK1-deficient embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10791-10802.

Andermatt, I., Wilson, N.H., Bergmann, T., Mauti, O., Gesemann, M., Sockanathan, S. and Stoeckli, E. (2014). Semaphorin 6B acts as a receptor in post-crossing commissural axon guidance. *Development* 141, 3709-3720.

Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. and Karin, M. (1988). The *Jun* proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55, 875-885.

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49, 729-739.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E. P., Filho, W.J., Lent, R. anderculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532-541.

Berezovska, O., McLean, P., Knowles, R., Frosh, M., Lu, F.M., Lux, S.E. and Hyman, B.T. (1999). Notch1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience* 93, 433-439.

Bikkavilli, R.K. and Malbon, C.C. (2009). Mitogen-activated protein kinases and Wnt/ β -catenin signaling. Molecular conversations among signaling pathways. *Communicative & Integrative Biology* 2, 46-49.

Bjorkblom, B., Ostman, N., Hongisto, V., Komarovski, V., Filén, J.J., Nyman, T.A., Kallunki, T., Courtney, M.J. and Coffey, E.T. (2005) Constitutively active cytoplasmic c-Jun N-terminal kinase 1 is a dominant regulator of dendritic architecture: role of microtubule-associated protein 2 as an effector. *J. Neurosci.* 25, 6350-6361.

Blesa, J. and Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Front. Neuroanat.* 8, 155.

Blondeau, A., Lucier, J-F., Matteau, D., Dumont, L., Rodrigue, S., Jacques, P-É. and Blouin, R. (2016). Dual leucine zipper kinase regulates expression of axon guidance genes in mouse neuronal cells. *Neural Development* 11, 13.

Bloom, A. J., Miller, B.R., Sanes, J.R. and DiAntonio, A. (2007). The requirement for PHR in CNS axon tract formation reveals the cortico striatal boundary as a choice point for cortical axons. *Genes Dev.* 21, 2593-2606.

Blouin, R. (2018). DLK (Dual Leucine Zipper-Bearing Kinase). Springer International Publishing AG 2018 S.Choi (ed.), *Encyclopedia of signaling Molecules* pp 1397-1402.

Blouin, R., Beaudoin, J., Bergeron, P., Nadeau, A. and Grondin, G. (1996). Cell-specific expression of the *ZPK* gene in adulte mouse tissues. *DNA and Cell Biology* 15, 631-642.

Bogoyevitch, M.A. and Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1061-1095.

Boldrini, M., Fulmore, A.C., Tartt, A.N., Simeon, R.L., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, B.G., Stankov, A., Arango, V., Dwork, J.A., Hen, R. and Mann, J.j. (2018). Human hippocampal neurogenesis persists throughout aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.

Brännvall, K., Korhonen, L. and Lindholm, D. (2002). Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21, 512-520.

Castro-Torres, R.D., Landa, J., Rabaza, M., Busquets, O., Olloquequi, J., Ettcheto, M., Beas-Zarate, C., Folch J., Camins, A., Auladell, C. *et al.* (2019). JNK isoforms are involved in the control of adult hippocampal neurogenesis in mice, both in physiological conditions and in an experimental model of temporal lobe epilepsy. *Mol. Neurobiol.* 56, 5856-5865.

Charbord, P. et Casteilla, L. (2011). La biologie de cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine. *Médecine/Sciences* 27, 261-267.

Chatton, B., Bocco, J.L., Goetz, J., Gaire, M., Lutz, Y. and Kedinger, C. (1994). Jun and Fos heterodimerize with ATF α , a member of the ATF/CREB family and modulate its transcriptional activity. *Oncogene* 9, 375-385.

Chen, M., Goeffroy, C.G., Wong, H.N., Tress, O., Nguyen, M.T., Holzman, L.B., Jin, Y. and Zheng, B. (2016). Leucine zipper-bearing kinase promotes axon growth in mammalian central nervous system neurones. *Scientific Reports* 6, 31482.

Chitnis, M.M., Yuen, J.S.P., Protheroe, A.S., Polak, M. and Macaulay, V.M. (2008). The type I insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.* 14, 6364-6370.

Chung, E.P., Cotter, J.D., Prakapenka, A.V., Cook, R.L., DiPerna, D.M. and Sirianni, R.W. (2020). Targeting small molecule delivery to the brain and spinal cord via intranasal administration of rabies virus glycoprotein (RVG29)-modified PLGA nanoparticles. *Pharmaceutics* 12, 93.

Crowder, M.K., Seacrist, C.D. and Blind, R.D. (2017). Phospholipid regulation of the nuclear receptor superfamily. *ADV. Biol. Regul.* 63, 6-14.

De Chiara, G., Piacentini, R., Fabiani, M., Mastrodonato, A., Marcocchini, M.E., Limongi, D., Napoletani, G., Protto, V., Coluccio, P., Celestino, I., Donatella, D. *et al.* (2019). Recurrent herpes simplex virus-1 infection induces hallmarks of neurodegeneration and cognitive deficits in mice. *PLoS Pathog.* 15, e1007617.

Dehairs, J., Talebi, A., Cherifi, Y. and Swinnen, J.V. (2016). CRISPR-ID: decoding CRISPR mediated indels by Sanger sequencing. *Scientific Reports* 6, 28973.

Démarchez, M. (2011). Biologie de la peau. Les cellules souches. Consulté le 6 juillet 2019. <https://biologiedelapeau.fr/spip.php?article60>.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M. and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Dhanasekaran, D.N. and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17, 5046-5061.

Donavan, N.J., Locascio, J.J., Marshall, G.A., Gatchel, J., Hanseeuw, B.J., Rentz, D.M., Johnson, K.A. and Sperling, R.A. (2018). Longitudinal association of amyloid- β and anxious-depressive symptoms in cognitively normal older adults. *Am. J. Psychiatry* 175, 530-537.

Douziech, M., Laberge, G., Grondin, G., Daigle, N. and R. Blouin. (1999). Localization of the mixed-lineage kinase DLK/MUK/ZPK to the golgi apparatus in NIH 3T3 cells. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1287-1296.

Eferl, R. and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edge sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 860-868.

Eriksson, P.S., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M. Nordborg, C., Peterson, D.A. and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313-1317.

Eto, K., Kawauchi, T., Osawa, M., Tabata, H. and Nakajima, K. (2010). Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. *Neurosci. Res.* 66, 37-45.

Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsua, J.E., Rosellò, L., Albà, M.M., Messeguer. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res.* 31, 3651-3653.

Ferraris, D., Yang, Z. and Welsbie, D. (2013). Dual leucine zipper kinase as a therapeutic target for neurodegenerative conditions. *Futur medicinal chemistry* 5, 1923-1934.

Fukuyama, K., Yoshida, M., Yamashita, A., Deyama, T., Baba, M., Suzuki, A., Mohri, H., Ikezawa, Z., Nakajima, H., Hirai, S and Ohno, S. (2000). MAPK Upstream Kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/Dual Leucine Zipper-bearing Kinase/Leucine Zipper protein kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 21247-21254.

Gallo, K.A. and Johnson, G.L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 663-672.

Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y and Martinou, J.C. (1998). Prevention of programmed cell death of sympatic neurons by the Bcl2- proto oncogene. *Science* 258, 302-304.

Gaudet, P., Livstone, M.S., Lewis, S.E. and Thomas, P.D. (2011). Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Briefings in Bioinformatics* 12, 449-462.

George, C., Gontier, G., Lacube, P., François, J.C., Holzenberger, M. and Aid, S. (2016). The Alzheimer's disease transcriptome mimics the neuroprotective signature of IGF-1 receptor-deficient neurones. *Brain* 140, 2012-2027.

Ghosh, A.S, Wang, B., Pozniak, C.D., Chen, M., Watts, R.J. and Lewcock, J.W. (2011). DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *J. Cell. Biol.* 194, 751-764.

Goodman, C.S., Kolodkin, A.L., Luo, Y, Puschel, A.W and Raper J.A. (1999). Unified nomenclature for the semaphorine/collapsins. *Cell* 97, 551-552.

Goodwani, S., Fernandez, C., Acton, P.J., Prevot-Buggia, V., McRenolds, M.L., Ma, J., Hui Hu, C., Hamby, M.E., Jiang, Y., Le, K. *et al.* (2020). Dual leucine zipper kinase is constitutively active in the adult brain and has both stress-induce and homeostatic functions. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4849-4873.

Guil, A.F.N., Oksdath, M., Weiss, L.a., Grassi, D.j., Sosa, L.J., Nieto, M. and Quiroga S. (2017). IGF-1 receptor regulates dynamic cerabral cortical migration. *Scientific Reports* 7, 7703-7712.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B. and Davis, R.J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 15, 2760-2770.

Hai, T. (2006). The ATF transcription factors in cellular adaptive responses. In: Ma J. (eds) *Gene Expression and Regulation*. (Springer, New York, NY).

Hao, Y., Frey, E., Yoon, C., Wong, H., Nestorovski, D., Holzman, B.L., Giger, R.J., DiAntonio, A. and Collins, C. (2016). An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK. *eLife* 5, e14048.

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia* 62, 1377-1391.

Hess, J., Angel, P. and Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science* 117, 5965-5973.

Hirai, S., Banba Y., Satake, T. and Ohno, S. (2011). Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the dual leucine zipper kinase-c-Jun N-terminal kinase pathway. *J. Neurosci.* 31, 6468-6480.

Hirai, S., de Cui, F., Miyata, T., Ogawa, M., Kiyonari, H., Suda, Y., Aizawa, S., Banba, Y. and Ohno, S. (2006). The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 26, 11992-12002.

Hirai, S., Kawaguchi, A., Hirasawa, R., Baba, M., Ohnishi, T. and Ohno, S. (2002). MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. *Development* 129, 4483-4495.

Hollos, P., Marchisella, F., and Coffey, E.T. (2018). JNK Regulation of depression and anxiety. *IOS Press* 3, 145-155.

Holzman, L.B., Merritt, S.E. and Fan, G. (1994). Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J. Biol. Chem.* 269, 30808-30817.

Housden, B.E. and Perrimon, N. (2016). Comparing CRISPR and RNAi-based screening technologies. *Nat. Biotechnol.* 34, 621-623.

Huntwork-Rodriguez, S., Wang, B., Watkins, T., Ghosh, A.S., Pozniak, C.D., Bustos, D., Newton, K., Kirkpatrick, D.S. and Lewcock, J.W. (2013). JNK mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis. *J. Cell. Biol* 202, 747-763.

Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villen, J., Hass, W., Sowa, M.e. and Gygi, S.P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143, 1174-1189.

Ito, T., X. Deng, B. Carr, and W.S. May. (1997). Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J. Biol. Chem.* 272, 11671-11673.

Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H. and Imai, K. (2002). Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2382-2392.

Ivanov, V. N., Bhounik, A., Krasilnikov, M., Raz, R., Owen-Schaub, L.B., Horvath, C.M. and Ronai, Z. (2001). Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol. Cell.* *7*, 517-528.

Jacobs, S., Lie, C.D., DeCicco, K.L., Shi, Y., DeLuca, L.M., Gage, F.H. and Evans, R.M. (2006). Retinoic acid is required early during adult neurogenesis in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 3902-3907.

Jin, Y. and Zheng, B. (2019). Multitasking: Dual Leucine Zipper-Bearing Kinases in neuronal development and stress management. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *35*, 501-521.

Jongbloets, B.C. and Parterkamp, R.J. (2014) Semaphorine signaling during development. *Development* *141*, 3292-3297.

Jonhson, G.L. and Nakamura, K. (2007). The c-Jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* *1773*, 1341-1348.

Kalunki, T., Deng, T., Hibi, M. and Karin, M. (1996). C-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* *87*, 929-939.

Katsimpardi, L. and Lledo, M-P. (2018). Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Current opinion in neurobiology* *53*, 131-138.

Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B. and Bagnard, D. (2013). Role of semaphorines during axon growth and guidance. *Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience, Austin, TX.* NBK6442.

Kowalczyk, A., Filipkowski, R.K., Rylski, M., Wilczynski, G.M., Konopacki, F.A., Jaworski, J., Ciemerych, M.A., Sicinski, P. and Kaczmarek, L. (2004). The critical role of cyclin D2 in adult neurogenesis. *The Journal of Biology* *167*, 209-213.

Kelkar, N., Gupta, S., Dickens, M. and Davis, R.J. (2000). Interaction of a mitogen- activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1030-1043.

Kuan, C-Y., Yang, D.D., Roy, D.R.S., Davis, R.J., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.

Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033.

Larhammar, M., Rodriguez, S.H., Jiang, Z., Salanoy, H., Gosh, A.S., Wang, B., Kaminker, J.S., Huang, K., Anderson, J.E., Siu, M. *et al.* (2017). Dual leucine zipper kinase-dependent PERK activation contributes to neuronal degeneration following insult. *eLife* 6, e20725.

Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R. (1987). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49, 741-752.

Lee, S.M., Tole, S., Grove, E. and McMahon, A.P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development* 127, 457-467.

Le Pichon, C.E., Meilandt, W.J., Domingez, S., Salanoy, H., Lin, H., Ngu, H., Gogineni, A., Gosh, A.S., Jiang, Z., Les, S.H. *et al.* (2017). Loss of dual leucine zipper kinase signaling is protective in animal models of neurodegenerative disease. *Sci. Transl. Med.* 9, eaag0394.

Leslie, J.R., Imai, F., Fukuhara, K., Takegahara, N., Rizvi, T.A., Friedel, R.H., Wang, F., Kumanogoh, A. and Yoshida, Y. (2011). Ectopic myelinating oligodendrocytes in the dorsal spinal cord as a consequence of altered semaphorin 6D signaling inhibit synapse formation. *Development* 138, 4085-4095.

Lin, A., Giuliano, C.J., Pallodino, A., John, K.M., Abramowicz, C., Yuan, M., Sausville, E.L., Lukow, D.A., Liu, L., Chait, A. *et al.* (2019). Off-target toxicity is a common mechanism of action of cancer drugs undergoing trials. *Sci. Transl. Med.* 11, eaaw8412.

Livet, J., Sigrist, M., Stroebel, S., De Paola, V., Price, S.R., Henderson, C.E., Jessell, T.M. and Arber, S. (2002). ETS gene *Pea3* controls the central position and terminal arborisation of spécifique motor neurone pools. *Neuron* 35, 877-892.

Lu, K.P., Liou, Y-C. and Zhou, X.Z. (2002). Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *TRENDS in Cell Biology* 12, 164-172.

Lukaszewicz, A.I., and Anderson, D.J. (2011). Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in cell cycle-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 11632-11637.

Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M.D., Gioeli, D., Black, B.E., Gordon, V., Spencer, A., Kesler, C.T., Eblen, S.T., Paschal, B.M. and Weber, M.J. (2006). Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization. *Mol. Endocrinol.* 20, 503-515.

Matsuoka, R.L., Sun., L.O., Katayama, K.I., Yoshida, Y. and Kolodkin, A.L. (2013). Sema6B, sema6C and sema6D expression and function during mammalian retinal development. *PLoS.* 8, e63207.

May, H.W.G., Allen, K.E., Clark, W., Funk, M. and Gillespie, D.A.F. (1998). Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 33429-33435.

Messeguer, X., Escudero, R., Farré, D., Nunez, O., Martinez, J. and Albà, M.M. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18, 333-334.

Miller, B.R., Press, C., Daniels, R.W., Sasaki, Y., Milbrandt, J. and DiAntonio, A. (2009). A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat. Neurosci.* 12, 387-389.

Mohammad, H., Marchisella, F., Ortega-Martinez, S., Hollos, P., Eerola, K., Komulainen., Kuleskaya, N., Freemantle, E., Fagerholm, V., Savontous, E. *et al.* (2018). JNK1 controls adult hippocampal neurogenesis and imposes cell-autonomous control of anxiety behaviour from the neurogenic niche. *Mol. Psychiatry* 23, 362-374.

Mundade, R., Ozer, H.G., Wei, H., Prabhu, L. and Lu, T. (2014). Role of ChIP-seq in the discovery of transcription factor binding sites, differential gene regulation mechanism, epigenetic marks and beyond. *Cell Cycle* 13, 2847-2852.

Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G.L and Peineau, S. (2013). The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Landes Bioscience* 2, e22925.

Nihalani, D., Merritt, S. and Holzman, L.B. (2000). Identification of structural and functional domains in mixed lineage kinase dual leucine zipper-bearing kinase required for complex formation and stress-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 275, 7273-7279.

Nihalani, D., Wong, H.N and Holzman, L.B. (2003). Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J. Biol. Chem.* 278, 28694-28702.

Oetjen, E. and Lemcke, T. (2016). Dual leucine zipper kinase (MAP3K12) modulators: a patent review (2010–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 26, 607-616.

Oliva, A.A., Atkins C.M.J., Copenagle, L. and Banker, G.A. (2006). Activated c-Jun N-terminal kinase is required for axon formation. *J. Neurosci.* 26, 9462-9470.

Ozdinler, P.H. and Macklis, J.D. (2006). IGF-1 specifically enhances axon outgrowth of corticospinal motoneurons. *Nature Neuroscience* 9, 1371-1381.

Papavassiliou, A.G., Treier, M. and Bohmann, D. (1995). Intramolecular signal transduction in c-Jun. *EMBO J.* 14, 2014-2019.

Parker, A.S., Cheville, J.C., Janney, C.A. and Cerhan, J.R. (2002). High expression levels of insulin-like growth factor-I receptor predict poor survival among women with clear-cell renal cell carcinomas. *Hum. Pathol.* 33, 801-805.

Parkinson, D.B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L.A., Woodhoo, A., Loyd, A.C., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R. and Jessen, K.R. (2008). c-Jun is a negative regulator of myelination. *J. Biol. Chem.* 283, 625-637.

Passegue, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U. and Wagner, E. F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking *junB* expression in the myeloid lineage. *Cell* 104, 21-32.

Patel, S., Cohen, F., Dean, B.J., De La Torre, K., Deshmukh, G., Estrada, A.A., Ghosh, A.S., Gibbons, P., Gustafson, A., Huestis, M.P. *et al.* (2015). Discovery of dual leucine zipper kinase (DLK, MAP3K12) inhibitors with activity in neurodegeneration models. *J. Med. Chem.* 58, 401-418.

Patel, S., Meilandt, W.J., Erickson, R.I., Chen, J., Deshmukh, G., Estrada, A.A., Fuji, R.N., Gibbons, P., Gustafson, A., Harris, S.F. *et al.* (2017). Selective inhibitors of Dual Leucine

Zipper Kinase (DLK, MAP3K12) with activity in a model of Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 60, 8083-8102.

Pennachio, L.A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M.A and Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* 14, 288-295.

Peretz, L., Besser, E., Hajbi, R., Casden, N., Ziv, D., Kronenberg, N., Gigi, L.B., Sweetat, S., Khawaled, S., Aqeilan, R. and Behar, O. (2018). Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. *Scientific Reports* 8, 93.

Ploia, C., Antoniou, X., Sclip, A., Grande, V., Cardinetti, D., Colombo, A., Canu, N., Benussi, L., Ghidoni, R., Forloni, G. *et al.* (2011). JNK plays a key role in tau hyperphosphorylation in Alzheimer's disease models. *J. Alzheimers Dis.* 26, 315-329.

Qiu, J., Cafferty, W.B.J., McMahon, S.B., and Thompson, S.W.N. (2005). Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *J. Neurosci.* 25, 1645-1653.

Qu, X., Wei, H., Zhai, Y., Que, H., Chen, Q., Tang, F., Wu, Y., Xing, G., Zhu, Y., Liu, S., Fan, M. and He, F. (2002). Identification, characterisation, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J. Biol. Chem.* 277, 35574-35585.

Reddy, U.R and Pleasure, D. (1994). Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 613-620.

Robitaille, H., Proulx, R., Robitaille, K., Blouin, R. and Germain, L. (2005). The mitogen-activated protein kinase kinase kinase dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) acts as a key regulator of keratinocyte terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* 280, 12732-12741.

Robitaille, H., Simard-Bisson, C., Larouche, D., Tanguay, R.M., Blouin, R. and Germain L. (2009). The small heat shock protein Hsp27 undergoes ERK-dependent phosphorylation and redistribution to the cytoskeleton in response to Dual leucine zipper-bearing kinase expression. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 74-85.

Rinschen, M.M., Yu, M.J., Wang, G., Boja, E.S., Hoffert, J.D., Pisitkun, T. and Knepper, M.A. (2010). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 3882-3887.

Sabapathya, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M. and Erwin F. Wagner. (1999). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mechanisms of Development* 89, 115-124.

Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlen, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. and Wagner, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 13, 607-619.

Shin, J.E., Cho, Y., Beirowski, B., Milbrandt, J., Cavalli, V. and DiAntonio, A. (2012^A). Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron* 74, 1015-1022.

Shin, J.E., Miller, R.B., Babetto, E., Cho, Y., Sasaki, Y., Qayum, S., Russler, V.E., Cavalli, V., Milbrandt, J. and DiAntonio, A. (2012^B). SCG10 is a JNK target in the axonal degeneration pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 3696-3705.

Siu, M., Sengupta, G. and Lewcock, W.J. (2018). Dual Leucine Zipper Kinase Inhibitors for the Treatment of Neurodegeneration. *J. Med. Chem.* 61, 8078-8087.

Spentzos, D., Cannistra, S.A., Grall, F., Levine, D.A., Pillay, K., Libermann, T.A. and Mantzoros, C.S. (2007). IGF axis gene expression patterns are prognostic of survival in epithelial ovarian cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 781-790.

St-Cyr, G. (2020). Étude des mécanismes moléculaires permettant à DLK de réguler la neuritogenèse. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke.

Stergiopoulos A. and Politis P.K. (2016). Nuclear receptor NR5A2 controls neural stem cell fate decisions during development. *Nature Comm.* 7, 12230.

Tedeschi, A. and Bradke, F. (2013). The DLK signaling pathway - a double-edge sword in neuronal development and regeneration. *Embo reports* 14, 605-614.

Tenenbaum, M., Plaisance, V., Boutry, R., Pawlowski, V., Jacovetti, C., Sanchez-Parra, C., Ezanno, H., Bourry, J., Beeler, N., Pasquetti, *et al.* (2020). The Map3k12 (Dlk)/JNK3 signaling pathway is required for pancreatic beta-cell proliferation during postnatal development. *Cell. Mol. Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03499-7>.

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Yamamoto, M., Makino, N., Takamatsu, H., Takegahara, N., Suto, F., Hori, M., Fujisawa, H., Kumanogoh, A. and Kikutani, H. (2008).

Repulsive and attractive semaphorins cooperate to direct the navigation of cardiac neural crest cells. *Developmental Biology* 321, 251-262.

Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., Hori, M. and Kikutani, H. (2004). Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signaling. *Nature Cell Biology* 6, 1204-1211.

Tremblay, R.G., Sikorska, M., Sandhu, Lanthier, Patricia, Ribecco-Lutkiewicz M. and Bani-Yaghoub. (2010). Differentiation of mouse Neuro 2a cells into dopamine neurones. *Journal of Neuroscience Methods* 186, 60-67.

Tu, H., Xu, C., Zhang, W., Liu, Q., Rondard, P., Pin, J.P. and Liu, J. (2010). GABA β receptor activation protects Neuron from apoptosis via IGF-1 receptor transactivation. *The journal of neuroscience* 30, 749-759.

Van Dam, D. and De Deyn, P.P. (2011). Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1285-1300.

van der Vaart, A., Rademakers, S. and Jansen, G. (2015). DLK-1/p38 MAP kinase signaling controls cilium length by regulating RAB-5 mediated endocytosis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 11, e1005733.

Wang, Y., Wang, M., Zheng, T., Hou, Y., Zhang, P., Tang, T., Wei, J. and Du, Q. (2020). Specificity profiling of CRISPR system reveals greatly enhanced off-target gene editing. *Nature Scientific Reports* 10, 2269-2277.

Watkins, T.A., Wang, B., Rodriguez, H.S., Yang, J., Jiang, Z., Andreson, E.J., Modrusan, Z., Kaminker, S.J., Lavigne, T.M., and Lewcock, W.J. (2013) DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4039-4044.

Watson, A., Eilers, A., Lallemand, D., Kyriakis, J., Rubin, L.L. and Ham, J. (1998). Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J. Neurosci.* 18, 751-756.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M. and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular Cell* 30, 678-688.

Wilkinson, G., Dennis, D. and Schuurmans, C. (2013). Proneural genes in neocortical development. *Neuroscience* 253, 256-273.

Wu, C.C., Wu, H.J., Wang, C.H., Lin, C.H., Hsu, S.C., Chen, Y-R., Hsiao, M., Schuyler, S.C., Lu, F.L., Ma, N. and Lu, J. (2015). Akt suppresses DLK for maintaining self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle* 14, 1207-1217.

Xiong, X., Wang, X., Ewanek, R., Bhat, P., Diantonio, A., Collins, C.A. (2010). Protein turnover of the Wallenda/DLK kinase regulates a retrograde response to axonal injury. *J. Cell. Biol.* 191, 211-223.

Xue, L. and Tao, W.A. (2013). Current technologies to identify kinase substrates in high throughput. *Front. Biol.* 8, 216-227.

Yamamoto, K., H. Ichijo, and S. J. Korsmeyer. (1999). Bcl-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G2/M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8469–8478.

Yamauchi, K., Osuka, K., Takayasu, M., Usada, N., Nakazawa, A., Nakahara, N., Yoshida, M., Aoshima, C., Hara, M. and Yoshida J. (2006). Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *Journal of Neurochemistry* 96, 1060-1070.

Yang, L., Wang, H., Liu, L. and Xie, A. (2018). The role of Insulin/IGF-1/PI3K/Akt/GSK3 β Signaling in Parkinson's disease dementia. *Front. Neurosci.* 12, 73.

Yoshida, H., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Cohen, P. and Goedert, M. (2004). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-jun N-terminal kinase (JNK). *Journal of Neurochemistry* 90, 352-358.

Zhang, Y., Liu, G. and Dong, Z. (2001). MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells. *J. Biol. Chem.* 276, 42534-42542.

Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A. and Bogoyevitch, M.A. (2016). JNK signaling regulation and functions based on complex protein-protein partnerships. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80, 793-835.

